EXPERIMENTE ÜBER DIE CYANID-UNEMPFINDLICHE ATMUNG DER PFLANZEN UND DIE FUNKTION DES UBICHINONS AM VERZWEIGUNGSPUNKT VON CYANID-SENSITIVER UND CYANID-INSENSITIVER ATMUNGSKETTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Noémi Lukács

aus Budapest/Ungarn

1981

81 86

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548903_0011

EXPERIMENTE ÜBER DIE CYANID-UNEMPFINDLICHE ATMUNG DER PFLANZEN UND DIE FUNKTION DES UBICHINONS AM VERZWEIGUNGSPUNKT VON CYANID-SENSITIVER UND CYANID-INSENSITIVER ATMUNGSKETTE

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Noémi Lukács

aus Budapest/Ungarn

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Januar 1981

Dekan:	Prof. Dr. E. Reinhard
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Ninnemann
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. Metzner

Pete, Joha und Anyu gewidmet

Frau Prof. Dr. H. Ninnemann möchte ich für die Anregung zu der Arbeit sowie für die großzügige Hilfe, die sie mir bei ihrer Durchführung zukommen ließ, danken.

Herrn Prof. Dr. H. Metzner danke ich ebenfalls für seine Unterstützung und Frau Dr. D. Harms für die Überlassung des Perkin-Elmer Spektralphotometers.

All denen, die mir bei der Fertigstellung der Arbeit behilflich waren, schulde ich ebenfalls Dank, insbesondere Herrn P. Symmons für kritische Diskussionen und die elektronische Textverarbeitung der Arbeit und Herrn L. Scheideler für das Anfertigen der Zeichnungen.

Abstract

LUKÁCS, NOÉMI

EXPERIMENTE ÜBER DIE CYANID-UNEMPFINDLICHE ATMUNG DER PFLANZEN UND DIE FUNKTION DES UBICHINONS AM VERZWEIGUNGSPUNKT VON CYANID-SENSITIVER UND CYANID-INSENSITIVER ATMUNGSKETTE

Die Wechselwirkung des 2,5-Dibromo-6-isopropyl-3-methyl-benzochinons (=DBMIB), eines Ubichinonanalogs, mit der Cyanid-sensitiven und -insensitiven Atmungskette der Mitochondrien wurde untersucht. DBMIB wirkte als Inhibitor der mitochondrialen Atmung am Succinat- und endogenen NADH-Dehydrogenase-Komplex bei Neurospora Wildstamm und poky-Mutante und als Inhibitor des Cyanid-insensitiven Atmungsweges bei Neurospora poky- und Arum maculatum Spadix-Mitochondrien. In Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum (Cyanid-sensitiv) war die Hemmung schwach. Sie war von der Mitochondrienkonzentration abhängig. Diese Abhängigkeit beruht wahrscheinlich darauf, daß die DBMIB-Konzentration in den Mitochondrien bei konstantem zugegebenem DBMIB bei niedriger Mitochondrienkonzentration höher lag. Die Assoziierung des DBMIB mit den Neurospora Wild- und poky-Mitochondrien kam durch Phasenverteilung und durch zusätzliche DBMIB-Bindung zustande. Außer der Atmungshemmung zeigte DBMIB eine komplexe Wechselwirkung mit der Atmungskette am Q-Zyklus. So wirkte DBMIB als autoxidabler Elektronenakzeptor, wobei Ausmaß und Geschwindigkeit der DBMIB-Reduktion vom DBMIB-zu-Mitochondrien-Konzentrationsverhältnis und von der Anwesenheit von Inhibitoren der Atmungskette abhängig waren. Die O_2-Verbrauchsraten der DBMIB-Autoxidation sind bei pH=8,5 mit O_2-Elektrode nachweisbar. DBMIB kann als Elektronenakzeptor in Anwesenheit von KCN, Antimycin und/oder Salicylhydroxamsäure zu reversibler Oxidation der Cytochrome b und zur Reduktion des Cytochrom c führen. DBMIB-Reduktion und Cytochrom c Rückreduktion verliefen zeitlich parallel; Antimycin veränderte die Geschwindigkeit und Kinetik der Reduktion. DBMIB-Reduktion überwiegend am Q-Zyklus wurde vorgeschlagen, wobei DBMIB auch als Inhibitor seiner eigenen Reduktion wirkte. Der andere Teil dieser Arbeit bestand in methodischen Untersuchungen, die die Erforschung der physiologischen Funktion der Cyanid-insensitiven Atmung erleichterten (z.B. Etablieren eines zu 50-90% Cyanid-insensitiven Kartoffel-Gewebekultur-Systems usw.).

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		1
MATERIAL UND METHODEN		11
M.1.	Untersuchte Organismen	11
M.1.1.	Neurospora crassa	11
	1.1.1. Auswahl und Anzucht der Stämme für die Mitochondrienisolierung	11
	1.1.2. Anzucht bei Belichtungs-experimenten	12
M.1.2.	Arum maculatum	13
	1.2.1. Sammeln von Blüten und Rhizomen	13
	1.2.2. Isolierung von Protoplasten und Einzelzellen aus Arum Spadix	14
	1.2.3. Gewebekultur aus verschiedenen Organen von Arum maculatum	15
M.1.3.	Arum cornutum	18
	1.3.1. Gewinnung und Lagerung von Arum cornutum Rhizomen zu Mitochondrienisolierung	18
	1.3.2. Treiben von Arum cornutum Rhizomen	18

M.1.4.	Solanum tuberosum Gewebekultur	19
	1.4.1. Normale Anzucht	19
	1.4.2. Medienvariationen	19
M.2.	Mitochondrienisolierung	20
	2.1. aus Neurospora crassa poky-Mutante und Wildstamm	20
	2.2. aus Arum maculatum und Arum cornutum	21
	2.3. aus Kartoffel-Gewebekultur	22
M.3.	Isolierung von submitochondrialen Partikeln	22
M.4.	Atmungsmessungen und Respirationsmedien	23
M.5.	Proteinbestimmung	25
M.6.	Cytochrom c-Isolierung aus Neurospora poky-Mycel und -Mitochondrien	26
M.7.	Untersuchung der DBMIB-Wirkung auf die mitochondriale Atmung	29
M.7.1.	Messung der Atmungshemmung und Bestimmung der I_{50}-Werte	29
M.7.2.	Bestimmung der DBMIB-Bindung in Neurospora Mitochondrien	30
M.7.3.	Verfolgung des DBMIB-Redoxzustandes in Mitochondrien	31
	7.3.1. Spektroskopische Experimente	31
	7.3.2. Bestimmung des Sauerstoffverbrauches nach pH-Schock	32

M.7.4. Änderungen im Reduktionsgrad der Cytochrome b und von Cytochrom c nach DBMIB-Zugabe 32

7.4.1. Aufnahme der Spektren 33

7.4.2. Kinetische Messungen 33

M.8. Statistische Auswertung der Ergebnisse 33

M.9. Abkürzungen 35

ERGEBNISSE 36

E.1. Charakterisierung der untersuchten Organismen und Mitochondrien 36

E.1.1. Neurospora crassa: Wachstum und Änderung der mitochondrialen Eigenschaften mit der Wachstumsphase 36

1.1.1. beim Neurospora crassa Wildstamm 36

1.1.2. bei Neurospora crassa poky-Mutante 41

E.1.2. Arum maculatum 47

1.2.1. Eigenschaften der Arum maculatum Spadix-Mitochondrien 47

E.1.3. Arum cornutum 50

1.3.1. Eigenschaften der Mitochondrien von Arum cornutum Rhizomen 50

1.3.2. CN^--insensitive Atmung bei Arum cornutum auch außerhalb des Spadix 51

E.2.	Neue methodische Ansätze	54
E.2.1.	Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung durch Belichtung beim Neurospora Wildstamm	54
E.2.2.	CN^--insensitive submitochondriale Partikel aus Mitochondrien von Arum Spadix	57
E.2.3.	Zwei Cytochrom c-Spezies in Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora	61
E.2.4.	Möglichkeiten der Einführung CN^--insensitiver Protoplasten und steriler Gewebekulturen als Untersuchungsobjekt	64
	2.4.1. Protoplasten aus Arum maculatum Spadix	64
	2.4.2. Das Fehlen der Kallusbildung bei Gewebekultur von Arum maculatum	65
	2.4.3. CN^--unempfindliche Atmung in Kartoffel-Gewebekulturen. Wachstumskurve und Änderung in der Atmung	66
E.3.	Wechselwirkung zwischen Dibromo-thymochinon und der Elektron-transportkette der Mitochondrien	77
E.3.1.	DBMIB als Inhibitor der mitochondrialen Atmung	77

E.3.1.1. Einfluß des DBMIB auf den CN^--sensitiven Atmungsweg 78

3.1.1.1. bei Mitochondrien des Wildstammes der Neurospora crassa 78

3.1.1.2. bei Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum 81

E.3.1.2. DBMIB-Hemmung der CN^--insensitiven Atmung 85

3.1.2.1. bei Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora crassa 85

3.1.2.2. bei Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum 87

E.3.1.3. Zusammenfassung des DBMIB-Einflusses auf die Atmung 88

E.3.2. Experimente zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von DBMIB auf die mitochondriale Atmung 93

E.3.2.1. Abhängigkeit der Hemmung von der Mitochondrienkonzentration 93

3.2.1.1. DBMIB-Hemmung der Atmung mit $DBMIB_{total} < I_{50}$ 93

3.2.1.1.1. bei Arum-Mitochondrien 93

3.2.1.1.2. bei Neurospora crassa Mitochondrien 95

3.2.1.2. I_{50}-Werte in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration 97

3.2.1.2.1. bei Mitochondrien von Neurospora crassa 97

3.2.1.2.2. bei CN^--insensitiven Arum Mitochondrien 100

E.3.2.2. DBMIB-Bindung in Mitochondrien des Wild- und poky- Stammes von Neurospora crassa 102

E.3.2.3. DBMIB-Reduktion und Autoxidation in Mitochondrien 111

3.2.3.1. Spektroskopische Untersuchungen 112

3.2.3.2. Sauerstoffverbrauch bei DBMIB-Autoxidation 124

E.3.2.4. Einfluß des DBMIB auf den Redoxzustand von verschiedenen Komponenten der Atmungskette 131

3.2.4.1. Spektrale Änderungen nach DBMIB-Zugabe 132

3.2.4.1.1. in Anwesenheit von Substrat und KCN bzw. Substrat + KCN + Antimycin 132

3.2.4.1.2. unter anderen Bedingungen 138

3.2.4.2. Parallele Redox-Änderungen bei DBMIB Cytochrom b-560 und Cytochrom c 144

3.2.4.2.1. in Anwesenheit von KCN 145

3.2.4.2.2. in Anwesenheit von KCN und Antimycin 147

DISKUSSION

D.1. Änderung der mitochondrialen Eigenschaften während der Entwicklung der Organismen 151

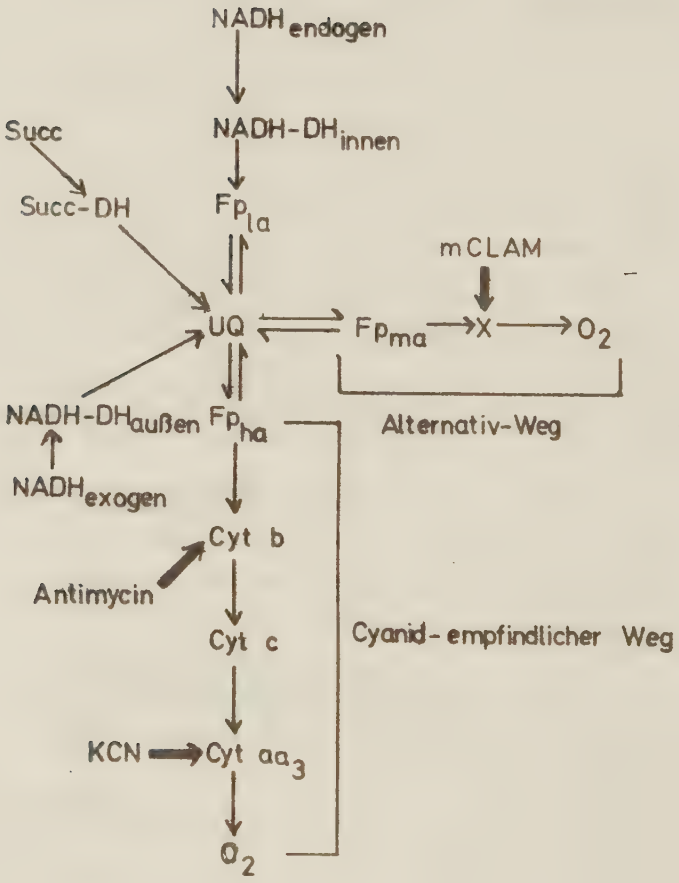
D.2. Neue methodische Ansätze zur Untersuchung der CN^--insensitiven Atmung 153

D.2.1.	Induktion der CN^--insensitiven Atmung durch Belichtung des Mycels des Wildstammes von Neurospora	153
D.2.2.	CN^--insensitive submitochondriale Partikel aus Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum	156
D.2.3.	Zwei Cytochrom c-Spezies in Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora	158
D.2.4.	Einfuhrung von sterilen Kartoffelgewebekulturen als neue Möglichkeit zur Untersuchung der CN^--insensitiver Atmung in vivo	162
D.3.	Wechselwirkung zwischen Dibromothymochinon und der Elektrontransportkette der Mitochondrien	166
D.3.1.	DBMIB als Inhibitor der mitochondrialen Atmung	166
D.3.2.	DBMIB als autoxidabler Elektronenakzeptor	176
D.3.3	Bedeutung und Möglichkeiten der Verwendung des DBMIB in weiterführenden Experimenten	185
ZUSAMMENFASSUNG		187
LITERATURVERZEICHNIS		191

EINLEITUNG

Die pflanzlichen Mitochondrien sind den tierischen Mitochondrien strukturell und funktionell sehr ähnlich, die Organisation ihrer Atmungskette ist jedoch komplexer. Die Hauptunterschiede bestehen darin,daß
1. die Pflanzen, abhängig von Spezies, Organ, Entwicklungsstadium usw., außer der normalen, Cyanid- und Antimycin-sensitiven Atmungskette auch einen Cyanid-unempfindlichen Atmungsweg besitzen können ("Alternative" Atmung);
2. die Pflanzenmitochondrien an der Außenseite der inneren Membran eine zusätzliche NADH-Dehydrogenase haben und so exogenes NADH direkt, ohne shuttle-Mechanismus oxidieren können.

Die wichtigsten Eigenschaften der pflanzlichen Mitochondrien haben IKUMA 1972 und PALMER 1976 in Übersichtsartikeln zusammengestellt; die bisherigen Kenntnisse über die Cyanid-resistente Atmung wurden von HENRY und NYNS 1975 und von SOLOMOS 1977 zusammengefaßt. SOLOMOS formulierte 1977 folgendes Schema des Elektronentransports durch den alternativen, Cyanid-unempfindlichen und den normalen, Cyanidempfindlichen Atmungsweg:



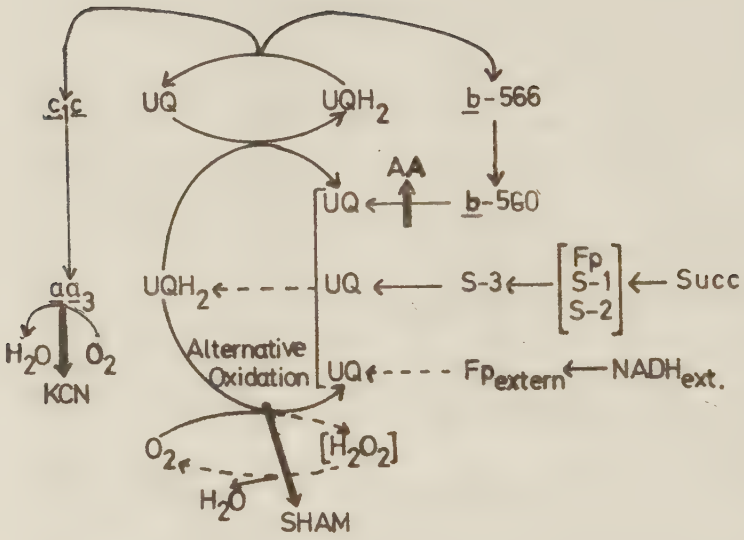
Schema 1: Die Atmungskette der Pflanzen nach SOLOMOS (1977). Die Bezeichnung der Flavoproteine erfolgte nach STOREY (1970a und 1971). Die Abkürzungen s. auf Seite 35

Aus dem Schema ist es ersichtlich,daß

1. der Verzweigungspunkt der beiden Atmungswege am oder in unmittelbarer Nähe des Ubichinons ist;
2. die an der äußeren Seite der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte sogenannte äußere NADH-Dehydrogenase ihre Elektronen ebenfalls zum Ubichinon transportiert;
3. bei dem Elektrontransport durch den alternativen Atmungsweg nur die erste, im Komplex I befindliche Phosphorylierungsstelle benutzt werden kann;
4. die alternative Oxidase durch mCLAM (und durch andere Benzhydroxamsäure Derivate) spezifisch hemmbar ist (SCHONBAUM et al. 1971).

Es sei hier ergänzend darauf hingewiesen, daß das Schema die Anordnung der Nichthämeisen-Proteine in der Atmungskette nicht zeigt (s. dafür RICH und BONNER 1978c, CAMMACK und PALMER 1977, WARDEN und EDWARDS 1976). Andererseits wird die Einordnung der verschiedenen Flavoproteine nach STOREY (STOREY 1970a und1971) in der Literatur nicht allgemein akzeptiert.

Die zentrale Bedeutung des Ubichinons für die CN^--insensitive Atmung wird in dem Modell von BONNER und RICH (1978) noch deutlicher hervorgehoben als in Schema 1, wobei die Autoren den Q-Cyclus (MITCHELL 1976) an pflanzliche Systeme mit zwei Atmungswegen angepaßt haben (Schema 2).



Schema 2: Der Verzweigungspunkt der CN^--sensitiven und -insensitiven Atmungswege am sogenannten Q-Zyklus nach BONNER und RICH 1978.
S-1, S-2 und S-3 symbolisieren die entsprechenden Eisen-Schwefel-Zentren, Fp Flavoprotein, UQ steht für oxidiertes, UQH_2 für reduziertes Ubichinon, b, c_1, c, und aa_3 für die entsprechenden Cytochrome.

Keines der beiden Modelle sagt etwas über die Natur der alternativen Oxidase aus, weil sie bisher nicht näher charakterisiert werden konnte, obwohl sie in der letzten Zeit teilweise gereinigt wurde (HUQ und PALMER

1978b, RICH 1978). Um die kontroversen Meinungen darzustellen, seien hier die im Laufe der letzten Jahren publizierten Hypothesen über die Natur der alternativen Oxidase zusammengefaßt.

(1) Die alternative Oxidase ist ein spezifisches Eisen-Schwefel-Protein (BENDALL und BONNER 1971).

Diese Hypothese beruhte darauf, daß einerseits durch spektroskopische Untersuchungen im sichtbaren Spektralbereich keine Cytochrome oder Flavoproteine als alternative Endoxidase identifiziert werden konnten, anderseits aber hemmten Eisen-Komplexbildner spezifisch die CN^--insensitive Atmung, und nach Inhibitor-Zugabe wurde ein ESR-Signal nahe g=2,0 beobachtet (BENDALL und BONNER 1971, SCHONBAUM et al. 1971).

(2) Ein Enzym der Succinat - Coenzym Q Oxidoreductase, möglicherweise das S-3 Eisen-Schwefel-Protein, kann unter bestimmten Bedingungen als alternative Oxidase dienen (LYR und SCHEWE 1975).

Die Hauptargumente dieser Hypothese:
-Carboxin, ein Inhibitor der Succinat-Dehydrogenase, hemmte die CN^--resistente Atmung.
- Trotz sorgfältiger Untersuchungen war es nicht möglich, ein neues autoxidables Eisen-Schwefel-Protein für den alternativen Weg zu identifizieren.
- Bei einigen Organismen können die Elektronen vom

exogenen NADH nur durch die Cytochrom-Kette transportiert werden, trotz vorhandener alternativer Oxidase (DIZENGREMEL 1975, DIZENGREMEL und LANCE 1976). Dies wiederum könnte darauf hindeuten, daß der Verzweigungspunkt der zwei Atmungswege vor der äußeren NADH-Dehydrogenase liegt.

(3) Es gibt keine CN^--insensitive Oxidase, sondern einen getrennten Ubichinon-Pool, welcher nichtenzymatisch und Cyanid unabhängig autoxidiert (RICH und BONNER 1978a und b).

Außer auf negativen ESR-Befunden (CAMMACK und PALMER 1977, RICH und BONNER 1978b) baute diese Hypothese darauf auf, daß durch verschiedene Experimente die essentielle Notwendigkeit des Ubichinon für die CN^--insensitive Oxidation gezeigt wurde (JAGOW und BOHRER 1975, HANSSENS und JAGOW, 1977) und Ergebnisse auf die Existenz verschiedener Q-Pools bzw. Ubichinon-bindender Proteine in Mitochondrien hingedeutet haben (NORLING et al. 1972, STOREY 1973, YU et al. 1977a und b, RICH et al. 1977, LUKACS und NINNEMANN 1977, DRABIKOWSKA 1977).

(4) Die zur Zeit allgemein akzeptierte Hypothese ist, daß die CN^--insensitive Oxidase ein Enzym unbekannter Natur ist, welches reduziertes Ubichinon auf Cyanid- und Antimycin-unempfindliche und SHAM- sensitive Weise

oxidiert (BONNER und RICH 1978).

Die experimentelle Grundlage dafür ist, daß aus Mitochondrien der Spadix von Arum maculatum ein Enzym angereichert werden konnte, welches Chinonanaloge auf diese Weise oxidiert (HUQ und PALMER 1978b, RICH 1978).

Unser Ziel war es, zunächst durch Hemmstoff-Experimente zu klären, ob Ubichinon in der CN^--unempfindlichen Elektronentransportkette bzw. in der Oxidation von externem NADH eine Rolle spielt. Als Hemmstoff wurde ein Chinonanalog verwendet: Dibromothymochinon = 2,5-Dibromo-6-isopropyl-3-methyl-benzochinon (=DBMIB).

DBMIB wurde als Photosyntheseinhibitor eingeführt (TREBST et al. 1970) und seither mehrfach als Inhibitor des Ubichinons beim bakteriellen (POOLE und HADDOCK 1975, EVANS und GOODING 1976 u.a.) bzw. mitochondrialen Elektronentransport verwendet (LOSCHEN und AZZI 1974, MELANDRI et al. 1974, SURKOV und KONSTANTINOV 1980). Eine DBMIB-Hemmung der alternativen Oxidase wurde neuerdings auch beschrieben (LUKACS und NINNEMANN 1977, DRABIKOWSKA 1977, SIEDOW et al. 1978, 1979).

Wie die nachfolgende Arbeit zeigt, ist die DBMIB-Hemmung in Mitochondrien vom verwendeten Substrat und vom

Atmungsweg abhängig. Dieser Befund und die Kontroverse in der Literatur (für Einzelheiten s. Diskussion) bzw. zwischen meinen Ergebnissen und der Literatur führten dazu, daß der Versuch unternommen wurde, den Wirkungsmechanismus des DBMIB und die Wechselwirkung zwischen DBMIB und den Mitochondrien zu klären.

Der andere Teil dieser Arbeit besteht in methodischen Untersuchungen, die die Erforschung der physiologischen Rolle der CN^--unempfindlichen Atmung erleichtern sollten.

Die physiologische Rolle der CN^--resistenten Atmung ist weitgehend unbekannt. Die zwei wichtigsten Hypothesen hierzu sind:

(1) Durch das Vorhandensein von endogenen Inhibitoren im Wirt bei Parasiten oder im Organismus selbst kann der normale Elektronentransport über die Cytochrome gehemmt werden, und die Organismen können in diesem Falle nur überleben, wenn die reduzierten Substrate und Coenzyme, wenn auch mit Energieverlust wieder oxidiert werden können (s. Übersichtsartikel KNOWLES 1976). Für das Vorkommen von möglichen endogenen Inhibitoren, z.B. von Cyanogen-glycosiden, sind Beispiele sowohl bei Mikroorganismen als auch bei höheren Pflanzen bekannt (EYJOLFSSEN 1970). Es ist ebenfalls bewiesen, daß die

alternative Atmung durch Hemmung der Cytochromkette mit Antimycin oder KCN induziert werden kann (LAMBOWITZ und SLAYMAN 1971).

(2) Die alternative, nicht-phosphorylierende Atmung erlaubt der Pflanze die Reoxidation reduzierter Coenzyme und Substrate auch bei hohen ATP-Konzentrationen, und dadurch den ungehinderten Ablauf verschiedener metabolischer Vorgänge, unabhängig von der Kopplung der Mitochondrien. Die Energie würde dabei durch die Substratkettenphosphorylierung geliefert (SCHONBAUM et al. 1971, PALMER 1976).

Für diese Hypothese spricht, daß in Neurospora-Mycelien von Stämmen mit CN^--sensitiver und mit CN^--insensitiver Atmung die ATP-Konzentration unter identischen Bedingungen unabhängig vom Atmungsweg gleich hoch ist (SLAYMAN et al. 1975). In höheren Pflanzen kommt die CN^--unempfindliche Atmung öfters in Speicherorganen (Arum-Spadix, Kartoffelknollen, Früchte) oder in schnell wachsenden Organismen vor und ist bei Induktion durch intensiven Kohlenhydrat-Abbau bzw. synthetische Vorgänge begleitet (SOLOMOS und LATIES 1975 und 1976). Die Hitzeentwicklung in der Blüte der Aroid-Pflanzen (MEEUSE 1975) könnte ein für die Pflanze günstiger Nebeneffekt sein, ist aber nicht bei allen CN^--insensitiven Organismen beobachtet worden.

Das Austesten dieser Hypothesen bereitete jedoch Schwierigkeiten. Bei Aronstab z.B. ist die Blütezeit sehr kurz, bei der Kartoffel ist die Induzierbarkeit bzw. das Vorhandensein der CN^--insensitiven Atmung stark vom Entwicklungszustand und von der Lagerzeit abhängig (LANG 1970, VAN DER PLAS und VERLEUR 1976). Die Induktoren können außer in die Atmung auch in eine Reihe anderer physiologischer Prozesse eingreifen.

Diese Schwierigkeiten könnten durch Einführung von CN^--unempfindlichen Protoplasten und Gewebekulturen als Untersuchungsobjekte behoben werden.

MATERIAL UND METHODEN

M.1. Untersuchte Organismen

M.1.1. Neurospora crassa

M.1.1.1. Auswahl und Anzucht der Stämme für die Mitochondrienisolierung

Eine Reihe von Cytochrom aa_3 und -b defizienten Neurospora Mutanten vom Fungal Genetics Stock Center (=FGSC), Arcata, California, U.S.A. wurde auf Cyanid-Resistenz getestet und für die weiteren Experimente eine poky f Mutante, Stamm FGSC#385 ausgewählt. Der Stamm wurde von GRIFFITHS et al. (1968) beschrieben. Als CN^--empfindliche Kontrolle wurde der Neurospora Wild-Stamm vom Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Holland, CBS 709.71, bzw. für die DBMIB-Bindung und einige spektroskopische Experimente der Stamm FGSC #987 verwendet.

Die Kulturen wurden in Vogel's Minimalmedium (VOGEL 1956) mit 2% Saccharose als C-Quelle gezüchtet. Es wurde mit 10^6 Konidien/ml angeimpft, die Flüssigkeitskulturen wuchsen bei 30°C im Dunkeln und

wurden mit 140 Upm geschüttelt. Als Zuchtgefäße wurden 2-l Erlenmeyerkolben (Weithals) mit 320 ml Medium verwendet. Wenn große Mitochondrienmengen benötigt wurden (z.B. für die Cytochrom c-Isolierung), wurde das Mycel in 10-l Flaschen mit je 8 l Medium gezüchtet und mit Pressluft begast.

Um das Mutieren der Stämme auf einem unbedeutenden Niveau zu halten, wurden mindestens einmal pro Jahr frische Stammkulturen von tiefgefrorenen Sporen angelegt.

M.1.1.2. Anzucht bei Belichtungsexperimenten

Zur Lichtinduktion der CN^--unempfindlichen Atmung wurden Flüssigkeitskulturen von Neurospora Wildstamm in 2-l Erlenmeyerkolben wie bei M.1.1.1. beschrieben gezüchtet und mit weißem Licht kontinuierlich belichtet. Die Kontrollen wurden mit Aluminiumfolie verdunkelt.

Als Lichtquelle diente eine Atralux Lampe (230 V, 300 W, 35°, OSRAM), womit die Kulturen aus 50 cm Entfernung bestrahlt wurden. In anderen Fällen wurde mit Quecksilber Hochdrucklampen (HQA 125 W, OSRAM) belichtet, die Beleuchtungsstärke betrug 400 W/m^2 vor und 40 W/m^2 hinter den Zuchtgefäßen. In beiden Fällen konnte eine kontinuierliche Erwärmung insbesondere der belichteten Proben nicht verhindert werden. Eine Plexiglas-Küvette mit kontinuierlichem Durchfluß von 0,5%-iger $CuSO_4$ -Lösung bzw. K1-Filter von Schott

(4 mm Dicke) wurden als Wärmefilter verwendet, waren aber bei den für die Induktion notwendigen hohen Beleuchtungsstärken nicht effektiv genug. Die Erwärmung der Proben betrug 5-12°C. Um den Wärmeeffekt alleine zu untersuchen, wurden Kontrollkulturen bei 37°C im Dunkeln gezüchtet.

M.1.2. Arum maculatum

M.1.2.1. Sammeln von Blüten und Rhizomen

Das klassische Objekt zur Untersuchung der CN^--insensitiven Atmung ist der sterile Spadix der Arum maculatum Blüte.

Die Arum-Blüten wurden im Mai in der Umgebung von Tübingen und Urach von wildwachsenden Pflanzen gesammelt, nach Entwicklungsstadium sortiert, und bei 4°C maximal eine Woche lang gelagert. Falls bei den einzelnen Experimenten nicht anders angegeben, wurden immer Blüten kurz vor oder kurz nach der Öffnung der Blüte, d.h. nach der Nomenklatur von JAMES und BEEVERS (1950) im γ- und δ-Stadium verwendet.

Rhizome zum Anlegen von Gewebekulturen wurden ebenfalls im Mai gesammelt; die Rhizome für Mitochondrienisolierungen von August bis September nach Eintrocknen der Blätter.

M.1.2.2. Isolierung von Protoplasten und Einzelzellen aus Arum Spadix

Die Isolierung wurde nach der Methode von TAKEBE et al. (1968) durchgeführt. 55g Spadix (unsteril) wurde in etwa 1 mm starke Scheiben geschnitten und in 50 ml 0,7M Mannitol mit folgenden Enzymen bei 4°C inkubiert:

a) 0,1% Macerozym + 0,5% K-Dextransulfat

b) wie a) + 0,3% Cellulase

(Macerozyme R10 und Onozuka Cellulase R10 stammten von Yakult Biochemicals Co., LTO, Nishinomiya, Japan, das K-Dextransulfat von Meioto Sangyo Co., Meiotosangyo, Nagoya, Japan).

Das pH des Inkubationsmediums wurde auf pH 5,6 eingestellt. Das Freiwerden der Zellen und Protoplasten wurde während der Inkubationszeit (bis zu 24 Stunden) mikroskopisch kontrolliert.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Zellen durch einen groben Filter, dann durch einen Filter von 40um Porengröße filtriert, welche die Protoplasten durchläßt, ganze Zellen aber zurückhält. Die im Filter befindlichen Zellen wurden in 0,7 M Mannitol aufgenommen und mit einer Protoplasten-Pipette wiederholt grob suspendiert, um das Freiwerden der Protoplasten mechanisch zu erleichtern. Diese Proben wurden ebenfalls filtriert.

Der Überstand der schnell absitzenden Protoplasten

wurde abgesaugt, und die Protoplasten wurden mit 0,7 M Mannitol zweimal gewaschen.

Der Sauerstoffverbrauch der Protoplasten wurde mit endogenen und zugegebenen Substraten kontrolliert.

M1.2.3. Gewebekultur aus verschiedenen Organen von Arum maculatum

Arum maculatum-Blätter, Rhizome und Blüten im α- und β-Stadium (vollständig geschlossene Blüten) wurden im Mai gesammelt; die Blätter und gereinigten Rhizome wurden mit Detergenz gewaschen, 15 Minuten in 5%iger Na-Hypochlorit Lösung sterilisiert und anschließend mit sterilem aqua dest. zweimal gewaschen.

Aus den Blättern wurden unter sterilen Bedingungen etwa 2-3 cm^2 große Stücke entlang der größeren Transportgefäße geschnitten, aus den Rhizomen etwa 2 mm starke Scheiben mit einem Durchmesser von 5-8 mm. Aus den Blüten wurden der sterile Teil des Spadix, die Haare und Staubblätter und der Stempel steril entnommen und zum Anlegen von Gewebekulturen verwendet.

Das Gewebekultur-Medium hatte folgende Zusammensetzung (die Angaben beziehen sich auf jeweils 1000 ml):

a) Hauptelemente:

$MgSO_4.7H_2O$	250 mg
$CaCl_2$	200 "
NaCl	10 "
KH_2PO_4	140 "
KNO_3	700 "
Fe-EDTA Lösung	6 ml
($5{,}57g\ FeSO_4.7H_2O + 7{,}45g\ Na_2EDTA$ per 1)	

b) Spurenelemente:

H_3BO_3	1 mg
$MnCl_2.4H_2O$	1 mg
$ZnCl_2$	0,4 mg
KI	20 µg
$CuSO_4.5H_2O$	25 µg
$Co(NO_3)_2.6H_2O$	30 µg
$Ni(NO_3)_2.6H_2O$	30 µg

c) Organische Komponenten:

Thiamin	1 mg
Nikotinsäure	1 mg
Ca-Pantothenat	1 mg
Biotin	10 µg
Inositol	100 mg
Pyridoxin	1 mg
Folsäure	10 mg

Als C - Quelle diente (1) 2% Saccharose oder
(2) 1% Saccharose plus 1% Glycerin

Die Art und Konzentration der zugegebenen Hormone varierte bei (1) und (2) wie folgt:

a) Naphthylessigsäure 10^{-6}, 10^{-7} bzw. 10^{-8} g/l
b) Indolessigsäure 10^{-6}, 10^{-7} bzw. 10^{-8} g/l
c) 2,4-Dichlorphenoxy-essigsäure 10^{-6}, 10^{-7} bzw. 10^{-8} g/l

Die Agarkonzentation (Difco Agar) betrug 0,5%, das pH 5,8.

Je Medienvariante und Organ wurden 2 Petrischalen mit 3-5 Ansätzen angelegt. Die mit Parafilm geschlossenen Schalen wurden bei Raumtemperatur in normalem Tageslicht gehalten.

Nach zwei Monaten wurden die sterilen Kulturen auf Murashige-Skoog- oder auf Gautheret-Medium mit 3% Saccharose und 6 mg/l Naphthylessigsäure und 0,6 mg/l Kinetin umgesetzt (MURASHIGE und SKOOG 1962, GAUTHERET 1942). Diese Media wurden auch für das weitere Umsetzen der Kulturen verwendet.

M.1.3. Arum cornutum

M.1.3.1. Gewinnung und Lagerung von Arum cornutum Rhizomen zur Mitochondrienisolierung

Arum cornutum Rhizome wurden aus kommerziellen Quellen bezogen und bei 4-10°C gelagert. Für die Mitochondrienisolierungen wurden entweder unmittelbar diese Rhizome während der Ruheperiode verwendet oder bereits getriebene Pflanzen im Freiland weiterkultiviert und zwischen Oktober und Januar zur Isolierung verwendet.

M.1.3.2. Treiben von Arum cornutum Rhizomen

Kommerziell bezogene Rhizome wurden in Blumenerde oder in feuchter Holzwolle bei 28-30°C im Licht oder im Dunkeln gehalten, um möglichst große Mengen von Spadices zur Mitochondrienisolierung zu gewinnen. Es soll hier bemerkt werden, daß auch unter optimalen Bedingungen (in Erde und im Gewächshaus gezogen) nicht mehr als 20-30 % der Pflanzen zum Blühen gebracht werden konnten.

M.1.4. Solanum tuberosum Gewebekultur

M.1.4.1. Normale Anzucht

Eine Suspensionskultur des dihaploiden Klons (2n= 24) von Solanum tuberosum mit der Klonnummer HH 258 wurde von Prof. Dr. G.Melchers, Max Planck Institut für Biologie, Tübingen, großzügig zur Verfügung gestellt. Bei Vorversuchen zeigten Kulturen von unterschiedlichen Alter hohe CN^--insensitive Atmung in normalem Kulturmedium. Die Kultur wurde nach der Methode von BEHNKE (1975) angelegt und in flüssigem Linsmaier-Skoog Medium mit 5 mg/l α-Naphthylessisäure, 40 mg/l Adenin und 25 ml/l Kokosmilch kultiviert (LINSMAIER und SKOOG 1965).

Die Kulturen wurden in 1-l Erlenmeyer Kolben mit vier Schikanen gezüchtet und bei 22°C mit einer Geschwindigkeit von 85 Upm geschüttelt. Da ich fand, daß Kulturen von 300-400 ml die optimalen Wachstumseigenschaften zeigten, wurden je 300 ml Kulturmedium mit 50 ml einer 1 Woche alten Kultur (entspricht ~120 mg Zellprotein) angeimpft und in 1-l Kolben gezüchtet.

M.1.4.2. Medienvariationen

Der Versuch wurde unternommen, das Verhältnis der CN^--resistenten und CN^--sensitiven Atmungswege durch Varieren der Medien zu verändern. Die verwendeten

Kombinationen waren:

(1) Bei unverändertem Grundmedium variierte C-Quellen, wie

a) 30,0 g/l Saccharose

b) 0,3 g/l "

c) 10,0 g/l Citronensäure

(2) Grundmedium mit 30g/l Saccharose, aber

a) ohne α - Naphthylessigsäure (=NES)

b) ohne Kokosmilch

c) ohne α - Naphthylessigsäure und ohne Kokosmilch

(3) Die Stickstoffquelle des Grundmediums wurde verändert (die zugegebene Stickstoffmenge blieb konstant bei 0,06 g atom/l). Anstatt das NH_4NO_3 und KNO_3 wurden

a) NH_4Cl 0.06 M

b) KNO_3 0.06 M

c) $(NH_4)_2HPO_4$ 0.03 M zugegeben.

M.2. Mitochondrienisolierung

M.2.1. Aus Neurospora crassa poky-Mutante und Wildstamm

Neurospora crassa-Mitochondrien aus dem Wildstamm und aus der poky-Mutante wurden, falls bei den einzelnen

Experimenten nicht anders angegeben, aus Mycel in der mittel- oder spätlogarithmischen Phase nach der Protoplasten-Methode von GREENAWALT et al. (1967) isoliert. Für die Herstellung von Protoplasten wurde β-Glucuronidase aus Helix pomatia Type H-2 (Sigma) oder Suc d'helix pomatia (L'Industrie Biologique Francaise) in einer Konzentration von 4 Volumen-% verwendet.

Am Ende der Isolierung wurden die Mitochondrien in Isolationsmedium IM-2 (Saccharose 0,33 M, EDTA 2 mM und Rinderserumalbumin 0,15%, pH = 7,0) sehr konzentriert aufgenommen und nur unmittelbar vor Gebrauch verdünnt.

M.2.2. Mitochondrienisolierung aus Arum maculatum und Arum cornutum

Die äußere, Anthocyan-haltige Schicht des Arum-Spadix wurde durch Abreiben mit Mull entfernt, und die gewaschenen Spadices wurden in millimeterstarke Scheiben geschnitten. Die Rhizomen wurden nach Entfernen der äußeren Schicht ebenfalls in dünne Scheiben geschnitten. Die Mitochondrienisolierung erfolgte nach der Methode von STOREY und BAHR (1969), sowohl für Spadix als auch für Rhizom-Mitochondrien.

M.2.3. Mitochondrienisolierung aus Kartoffel-Gewebekultur

Die Kartoffel Mitochondrien wurden mit leichten Modifikationen auch nach der Methode von STOREY und BAHR (1969) isoliert.

Die filtrierten, gewaschenen Zellen wurden in Isoliermedium KIM-4 (Mannitol 0,3 M, EDTA 2 mM, Cystein 4 mM, Morpholinopropansulfonsäure 10 mM und Rinderserumalbumin 0,1%, pH = 7,4) suspendiert, mit einem Braun-Mixer zweimal 5 Sekunden homogenisiert und filtriert. Das Zentrifugieren und Waschen erfolgte wie bei STOREY und BAHR (1969).

M.3. Isolierung von submitochondrialen Partikeln

Es wurden verschiedene Methoden für die Isolierung von submitochondrialen Partikeln (=SMP) ausprobiert, wie Ultraschallbehandlung, verschiedene Detergenzien und ein milder pH-Schock nach CRANE et al. (1956). Zur erfolgreichen Isolierung von CN^--resistenten SMP hat nur die pH-Schock Methode geführt, daher soll hier nur diese beschrieben werden.

Als Ausgangsmaterial dienten in flüssiger Luft eingefrorene Arum-Spadix-Mitochondrien, wobei betont werden muß, daß die Aktivität des Ausgangsmaterials die Qualität der SMP stark beeinflußt.

Das pH der Mitochondriensuspension wurde mit KOH auf pH 8,5 eingestellt und die Suspension auf Eis 30 Minuten inkubiert. Die Mitochondrien wurden mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator durch zehn Zyklen intensiv homogenisiert, dann in einer Beckmann Spinco Zentrifuge mit dem Rotor Nr. 30 bei 19,600g 5 Minuten lang ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde mit 100 000g 30 Minuten zentrifugiert, die SMP befanden sich im Niederschlag dieser Zentrifugation (SMP I). Der Niederschlag der 19,600g Zentrifugation wurde meistens noch einmal extrahiert (SMP II). Die Partikel wurden mit dem Respirationsmedium (s. M.4.) aufgenommen, und das pH wurde mit Essigsäure auf pH 7,0 eingestellt.

Um die Succinat-Dehydrogenase nicht zu inaktivieren, wurden alle Isolationsschritte in Anwesenheit von 2 mM Malonat durchgeführt .

Die SMP können tiefgefroren einige Monate ohne bedeutenden Aktivitätsverlust gehalten werden.

M.4. Atmungsmessungen und Respirationsmedien

Die Atmungsraten wurden mit einer Sauerstoff-Elektrode vom Clark-Typ (Yellow Springs Instruments No. 4004) bei Raumtemperatur vermessen.

Als Respirationsmedium für die Organismen dienten die jeweiligen Kulturmedien. Das Kulturmedium für

Neurospora war Vogel's Minimalmedium (S. 11), für die Kartoffel-Kulturen das Linsmaier-Skoog-Medium (S. 19).

Die mitochondriale Atmung wurde in folgenden Medien gemessen:

a) bei der Neurospora crassa poky-Mutante und dem Wildstamm in

280 mM	Saccharose
8 mM	Tris
5 mM	NaH_2PO_4
5 mM	$MgCl_2$
0,7 mM	EDTA
20 mM	Glucose pH = 7,2 (LAMBOWITZ et al. 1972b)

b) bei Arum Spadix- und Rhizom- bzw. Kartoffel-Mitochondrien in

300 mM	Mannitol
10 mM	KCl
5 mM	$MgCl_2$
10 mM	Kaliumphosphat-Puffer pH = 7,2

(LANCE und BONNER, 1968)

Die verwendeten Substrat-, Inhibitor-, und Entkoppler-Konzentrationen werden bei den Tabellen und Abbildungen einzeln aufgeführt. In vielen Fällen mußten die Mitochondrien mit Succinat als Substrat vorinkubiert werden, um eine konstante Succinat-Oxidase Aktivität zu erreichen. Bei Kartoffel-Mitochondrien war die Inkubation

mit Succinat alleine für die Aktivierung der Succinat-Dehydrogenase nicht ausreichend, hier mußte auch ATP zugegeben werden, um maximale Atmungsraten zu erzielen.

M.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) in Anwesenheit von 0,1% Na-Desoxycholat durchgeführt. Für die Proteinbestimmung wurden folgende Reagenzien verwendet:

Reagenz A: 20g Na_2CO_3 (entspricht 32g $Na_2CO_3.10H_2O$) und 4g NaOH in 1 l aqua dest. gelöst.

Reagenz B: eine Mischung von B_1 und B_2 in 1:1 Verhältnis, wobei B_1 eine 1%-ige $CuSO_4.5H_2O$ Lösung, und B_2 ein 2%-ige Natriumkaliumtartarat-Lösung sind.

Reagenz C bestand aus 50 ml Reagenz A plus 1 ml Reagenz B.

Folin-Ciocalteus Phenol-Reagenz (Merck) wurde zum Gebrauch verdünnt: zu 8 ml Phenol-Reagenz wurde 5 ml aqua dest. zugegeben.

Reagenz B, C und das verdünnte Folin-Reagenz wurden jeden Tag frisch hergestellt.

50 ul 10%-iges Na-Desoxycholat und die Proteinlösung wurden einpipettiert und mit Reagenz C auf 4 ml aufgefüllt. Dann wurde 0,4 ml verdünnte Folin-Ciocalteus

Reagenz zugegeben und die Probe rasch umgeschüttelt. Die Proben wurden bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubiert, anschließend die Extinktionen bei 660nm Wellenlänge vermessen. Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin als Standard aufgenommen.

Für die Aufnahme der Wachstumskurven durch Bestimmung der Proteinzunahme wurden die Zellen von den Medien getrennt, gewaschen (je nach Notwendigkeit konzentriert), in aqua dest. aufgenommen und durch intensive maschinelle Homogenisierung (Potter-Elvehjem) plus Ultraschallbehandlung aufgeschlagen. Die Ultraschallbehandlung erfolgte, unter ständiger Kühlung, mit einem Branson Sonifier ausgerüstet mit einem Mikrorüssel bei maximaler Intensität, und dauerte 10X20 Sekunden bei Neurospora Mycel, und 5X20Sekunden bei Kartoffelzellen.

In einigen Fällen wurde die Proteinbestimmung auch nach der Biuret-Methode (GORNALL et al. 1949) vorgenommen. Die Biuret-Methode ist unbrauchbar beim Neurospora poky-Stamm, weil eine Eigensubstanz des Pilzes die Nachweis-Reaktion stört.

M.6. Cytochrom c-Isolierung aus Neurospora poky-Mycel und poky-Mitochondrien

Die Cytochrom c-Isolierung erfolgte im wesentlichen

nach der Methode von SCOTT und MITCHELL (1969).

Als Ausgangsmaterial wurden 70-80 g (Naßgewicht) 19 Stunden altes Mycel, oder 180 mg Mitochondrienprotein aus gleichaltrigem Neurospora poky-Mycel verwendet.

Die Mitochondrien wurden nach der Protoplasten-Methode (GREENAWALT et al., 1967) isoliert und sehr konzentriert (etwa 35 mg Protein/ml) in Isolationspuffer aufgenommen. Sie wurden mit flüssiger Luft eingefroren und gelagert. Die Cytochrom c-Extraktion aus Mitochondrien wurde folgendermaßen durchgeführt: 5 ml Mitochondriensuspension wurde mit 20 ml 0,05M Tris-Cl Puffer versehen und das pH auf 8,6 eingestellt. Die Suspension wurde in einem Rosett-Gefäß unter ständiger Kühlung 5X30 Sekunden mit Ultraschall (Branson Sonifier mit Mikrorüssel bei Stufe 7) behandelt und anschließend mit 100,000g 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit etwa 50 ml aqua dest. verdünnt.

Die Extraktion des FGSC #385 Mycels wurde nach SCOTT und MITCHELL (1969) durchgeführt. Abweichend von SCOTT und MITCHELL (1969) wurde der Extrakt nicht an Hyflo Super Gel, sondern an Amberlite CG 50 II (Serva) im Batch-Verfahren adsorbiert. Das Gel wurde nach HAGIHARA et al. (1958) vorbereitet und mit Hypochlorit vorbehandelt. Der Mitochondrien-Extrakt wurde mit 50ml, der Mycelextrakt mit 100-150 ml Gelsuspension 30 Minuten gerührt, auf eine Glasfritte gegeben, mit aqua dest. nachgewaschen und mit 0,5 M Ammoniumphosphat-Puffer pH =

7,0 eluiert. Diese Änderung bewirkte schon beim ersten chromatographischen Schritt eine viel größere Reinigung und ist außerdem schneller als die Original-Methode.

Das Eluat wurde weiter nach SCOTT und MITCHELL (1969) behandelt. Für alle weiteren chromatographischen Schritte wurde mit 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer pH = 7,0 und 10^{-4} M Kaliumferricyanid äquilibriertes Amberlite CG 50 II verwendet. Das Volumen der ersten Säule für die Cytochrom c-Extraktion aus Mycel war 50 ml, sonst wurden 15-18 ml (Durchmesser = 0,8cm) Säulen verwendet. Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 5 ml/Stunde, das Fraktionsvolumen betrug 1 ml. Die Cytochrom c-Fraktionen wurden mit einem linearen Gradient aus je 50 ml

a) 0,05 M K - Phosphat pH = 7,0 plus 10^{-4} M K - Ferricyanid

b) wie a) plus 0,5 M NaCl

eluiert.

Alle chromatographischen Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, die Säulen waren lichtgeschützt.

Die Extinktion der Fraktionen wurde bei 550 nm oder bei niedrigen Cytochrom c Konzentrationen bei 410 nm nach Reduktion mit Dithionit gemessen.

M.7. Untersuchung der DBMIB-Wirkung auf die mitochondriale Atmung.

M.7.1. Messung der Atmungshemmung und Bestimmung der I_{50}-Werte

Dibromothymochinon (2,5-Dibromo-6-isopropyl-3-methyl-benzochinon, in Folgenden: DBMIB) in oxidierter und reduzierter Form wurde uns von Dr. W.HÄHNEL und Dr.W.OETTMEIER, Ruhr Universität, Bochum, großzügig zur Verfügung gestellt. Beide Substanzen wurden bei -20°C gelagert, $DBMIBH_2$ unter Stickstoff. Aus dem oxidierten DBMIB wurde eine 10mM Stammlösung in absolutem Äthanol hergestellt, ständig dunkel und kühl gehalten und für Experimente 2-4 Wochen lang verwendet. Die Konzentration der Stammlösung wurde spektroskopisch bei 288nm mit einem Extinktionskoeffizient $\varepsilon = 12{,}9\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ bestimmt.

Für die Atmungsmessung wurden verdünnte Mitochondrien mit DBMIB 10 Minuten auf Eis und 5 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Wenn Succinat als Substrat verwendet wurde, wurde auch die Inkubation in Anwesenheit von 10 mM Succinat durchgeführt (die Reihenfolge der Zugaben war immer zuerst DBMIB und ein bis zwei Minuten später Succinat). Falls von dieser Inkubationsreihenfolge abgewichen wurde, ist das genaue Vorgehen bei den einzelnen Experimenten angegeben.

Die Atmungsraten wurden 2-3 Minuten nach Substratzugabe bestimmt.

Die für die halb-maximale Hemmung des Sauerstoffverbrauchs notwendige DBMIB-Konzentration (I_{50}-Werte) wurden aus den einzelnen Experimenten ermittelt. In Tabelle 8 und 9 sind Durchschnittswerte verschiedener Experimente dargestellt, was wegen der Abhängigkeit der DBMIB-Hemmung von der Mitochondrienkonzentration (s. E.3.2.1.) nicht völlig gerechtfertigt ist, aber für praktische Zwecke eine bessere Orientierung erlaubt.

M.7.2. Bestimmung der DBMIB-Bindung in Neurospora-Mitochondrien

Die Mitochondrien für die Bindungsexperimente wurden immer aus 16 Stunden altem Mycel von Neurospora crassa Wildstamm oder der poky-Mutante isoliert. Die Mitochondrien wurden in Respirationsmedium (s. M.4.) mit verschiedenen DBMIB-Konzentrationen inkubiert: 10 Minuten auf Eis, dann 10 Minuten bei Zimmertemperatur. Anschließend wurde die Suspension in einer gekühlten (0-4°C) Sorvall Zentrifuge im SS 34 Rotor mit 26 500g 20 Minuten zentrifugiert.
Die Überstände wurden bei 290 nm gegen den Überstand der unbehandelten Kontrolle vermessen. Als Extinktionskoeffizient in dem wässrigen Meßpuffer wurde

ε = 11,4 mM^{-1} cm^{-1} ermittelt. Die gebundene DBMIB-Menge wurde aus der Differenz $DBMIB_{total}$-$DBMIB_{frei}$ errechnet.

M.7.3. Verfolgung des DBMIB Redoxzustandes in Mitochondrien

M.7.3.1. Spektroskopische Experimente

Die DBMIB Spektren (zwischen 260 und 400 nm) und Redoxkinetiken wurden in einem Perkin-Elmer 356 Zweistrahl-Spektrophotometer unter aeroben Bedingungen aufgenommen. Die DBMIB Kinetiken wurden entweder als $\Delta E_{290-370nm}$, oder bei λ =290 nm gegen oxidierte Mitochondrien als Referenz mit der Zeit verfolgt. Die reduzierte DBMIB-Menge wurde aus der maximalen Extinktionsabnahme unter der Annahme geschätzt, daß das reduzierte DBMIB bei 290 nm keine Absorption habe, was zu einer Unterschätzung der DBMIB-Reduktion führen kann. (Die Extinktionskoeffizienten des oxidierten bzw. reduzierten DBMIB betragen ε_{288nm}=12,9 bzw. ε_{297}=5,5 mM^{-1} cm^{-1}, W.OETTMEIER, persönliche Mitteilung). Die Extinktionskoeffizienten des oxidierten DBMIB bei 290-370 nm wurden in der jeweiligen Mitochondriensuspension experimentell bestimmt

M.7.3.2. Bestimmung des Sauerstoffverbrauches nach pH-Schock

Der aus der DBMIB-Autoxidation resultierende Sauerstoffverbrauch liegt in intakten Mitochondrien in der Größenordnung des Messfehlers des Sauerstoffelektroden-Systems. Um das in Mitochondrien reduzierte DBMIB für Sauerstoff zugänglich zu machen, wurden die Mitochondrien, deren normale Endoxidasen bereits vorher blockiert waren, mit konzentrierter KOH versetzt und das pH dadurch auf pH 8,5-9,0 verstellt (pH-Schock). Der entstehende Sauerstoffverbrauch wurde wie bei M.4. ermittelt.

M.7.4. Änderungen im Reduktionsgrad der Cytochrome b und von Cytochrom c nach DBMIB-Zugabe

Die Messungen wurden im Perkin-Elmer 356 Spektralphotometer in 3 ml Küvetten mit 1 cm Lichtweg durchgeführt. Das Reaktionsmedium war das normale Respirationsmedium für Neurospora crassa-Mitochondrien. Die Mitochondrienkonzentration war bei allen Messungen 0,3 mg Protein/ml; die DBMIB Konzentration betrug 33 µM, was einem Verhältnis von 111 nmol DBMIB/mg mitochondrialem Protein entspricht. Vor DBMIB-Zugabe wurden die Mitochondrien mit den angegebenen Substraten und Inhibitoren 5 Minuten lang vorinkubiert.

M.7.4.1. Aufnahme der Spektren

Die Spektren wurden mit einem Perkin-Elmer 356 Spektrophotometer zwischen 650 und 400 nm gegen oxidierte Mitochondrien mit einer Geschwindigkeit von 120 nm/min aufgenommen.

M.7.4.2. Kinetische Messungen

Die Redox-Kinetiken von Cytochrom b und c wurden nach JAGOW und BOHRER (1975) verfolgt. Die Extinktionskoeffizienten waren für Cytochrom b $\varepsilon_{560-575nm} = 23.4\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ (ZAUGG und RIESKE 1962), für Cytochrom c $\varepsilon_{550-542nm} = 18.7\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ (MARGOLIASH und FROHWIRT 1959).

Die Totalkonzentration der Cytochrome wurde mit Hilfe von Dithionit-reduzierten Mitochondrien errechnet.

Bei dem Wellenlängenpaar 560-575nm werden in Neurospora überwiegend Änderungen im Reduktionsgrad des kurzwelligen Cytochrom b_{560} (entspricht Cytochrom b_{562} bei tierischen Mitochondrien) erfasst.

M.8. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die in den Tabellen angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte ±S.E.M. (Standard Error of

the Mean = Standardabweichung des Mittelwertes) Der S.E.M. wurde nach folgenden Formeln berechnet:

$$S.E.M. = \sqrt{\frac{s^2}{n}}$$

$$s^2 = \frac{\sum x^2 - \frac{\left(\sum x\right)^2}{n}}{n - 1}$$

wobei x die einzelnen Messwerte, n die Anzahl der Messungen sind und $\sum$ Summe bezeichnet.

Um die statistische Signifikanz (Wahrscheinlichkeit) einer Korrelation zwischen Mitochondrienkonzentration und der Größe der I_{50}-Werte zu bestimmen, wurde der Korrelationskoefficient r berechnet:

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x \cdot s_y}$$

wobei x und y die zwei Variablen sind und s die Standardabweichung ist. s_x und s_y wurden wie oben angegeben gerechnet, s_{xy} nach dem Formel:

$$s_{xy} = \frac{\sum (x-\bar{x})(y-\bar{y})}{(n-1)}$$

M.9. Abkürzungen

AA	Antimycin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
mCLAM	m-Chlorohydroxamsäure
(Coenzym)Q	Ubichinon-10
Cyt	Cytochrom
DBMIB	Dibromothymochinon=2,5-Dibromo-6-isopropyl-3-methyl-benzochinon.
$DBMIBH_2$	reduziertes DBMIB
Fp_{ha}	nichtfluoreszierendes Flavoprotein mit einem Redoxpotential von $E_{m7,2}$=+110 mV (STOREY 1970a, 1971)
Fp_{la}	Flavoprotein mit einem niedrigem Redoxpotential von $E_{m7,2}$=-70 mV (STOREY 1971)
Fp_{ma}	Flavoprotein mit einem mittleren Redoxpotential von $E_{m7,2}$=+20 mV (STOREY 1971)
M	Mitochondrien in der angegebenen Konzentration (in Abbildungen)
SHAM	Salicylhydroxamsäure
Succ	Succinat (in Abbildungen)
UQ	Ubichinon-10
UQH_2	reduziertes Ubichinon

ERGEBNISSE

E.1. Charakterisierung der untersuchten Organismen und Mitochondrien

E.1.1. Neurospora crassa
Wachstum und Änderung der mitochondrialen Eigenschaften mit der Wachstumsphase

In der Literatur wurde beschrieben, daß die Cyanid-Unempfindlichkeit und der Cytochrom-Oxidase-Gehalt der Neurospora poky-Mutante sich während des Mycelwachstum ändern (HASKINS et al. 1953, KLEIN et al. 1975). So schien es sinnvoll, das Wachstum und parallel dazu die Eigenschaften der Mitochondrien in Abhängigkeit vom Alter des Organismus zu untersuchen.

E1.1.1. beim Neurospora crassa Wildstamm

Abbildung 1. zeigt die Wachstumskurve des Neurospora Wildstamms und die Änderungen der Atmungsraten während des Wachstums; die pH-Änderungen im Medium sind ebenfalls gezeigt. Das Verfolgen der pH-Änderung bietet eine schnelle und einfache Möglichkeit zur Bestimmung der Wachstumsphase bis zum Anfang der stationären Phase.

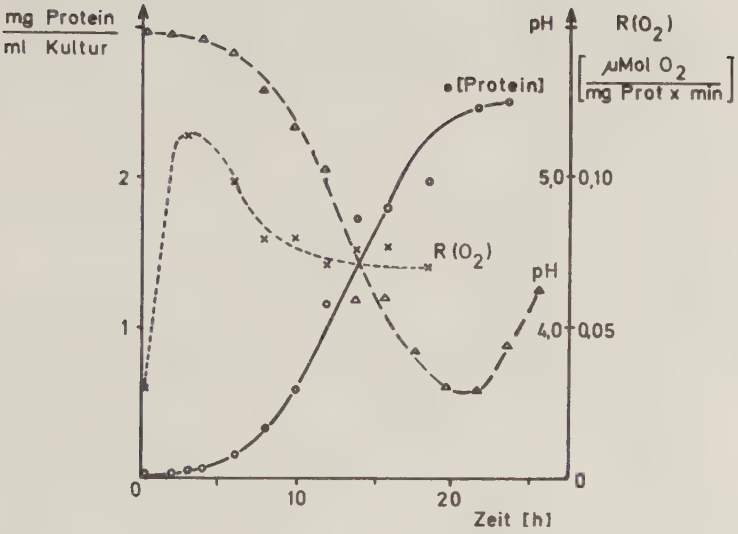


Abb. 1 Wachstumskurve des Neurospora crassa Wildstammes (CBS 709.71), pH der Kultur und Sauerstoffverbrauchsraten in Abhängigkeit von den Anzuchtszeiten.
Der Sauerstoffverbrauch wurde in Vogel's Minimalmedium mit 2% Glucose bestimmt.

Aus verschieden altem Mycel (zwischen 4 und 24 Stunden) wurden Mitochondrien isoliert; deren Eigenschaften faßt Tabelle 1 zusammen. Sowohl die Atmung des Mycels als auch die der Mitochondrien des Neurospora Wildstammes ist im untersuchten Zeitraum CN^--sensitiv. Die Atmungsaktivität mit Succinat als Substrat nimmt bis zu einem Alter von 16 Stunden zu, dann leicht ab. Mit exogenem NADH ist eine kontinuierliche Abnahme der Atmungsraten zu beobachten. Interessant ist, daß die

Alter h \ Substrat	R.C.	15mM Succinat	15mM Succinat + 1mM ADP	2mM NADH	2mM NADH + 1mM ADP	15mM Citrat	15mM Citrat + 1mM ADP
4	1,62	59,3±4,4	97,2±12,6	104,0±35,8	190,0±36,3	22,9± 4,1	37,7±10,6
8	1,59	60,6±28,2	93,8±53,6	61,6± 1,0	114,1±31,5	25,6±11,3	36,0±14,8
12	2,24	76,5± 5,9	175,4±22,6	61,6± 2,9	133,8± 6,0	22,3± 2,2	52,6±11,9
16	2,14	99,3±10,1	218,1±26,2	42,6± 1,6	98,7±11,1	25,8± 7,1	54,0±19,7
20	2,10	63,7± 9,2	140,7±19,4	31,7±18,4	69,3±26,5	28,3± 0,6	59,5± 3,3
24	2,05	78,9± 4,0	165,5± 3,8	32,5± 5,9	67,0±13,1	29,5± 0,0	51,0± 2,9

Tabelle 1: Änderung der Atmungsraten mit verschiedenen Substraten bei Mitochondrien des Neurospora Wildstamms in Abhängigkeit vom Alter des Mycels.

Die Atmungsraten sind in [nmol O_2/min/mg Protein] angegeben.
R.C. = Respiratorische Kontrolle.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von mindestens zwei Mitochondrienisolierungen.

maximale Aktivität der exogenen NADH-Oxidase mit dem Maximum der Atmungsaktivität des Mycels (vgl. Abb.1.) zeitlich zusammenfällt, was einen eventuellen Zusammenhang vermuten lässt.

Mit Citrat (d.h. endogenem NADH) als Substrat kann man nicht nur eine quantitative, sondern auch eine qualitative Änderung beobachten. Rotenon (10-20 µM) hemmt die Atmung bei Mitochondrien aus 4 bzw. 8 Stunden altem Mycel nur geringfügig (0-20%) und unspezifisch, weil eine entsprechende Hemmung auch bei den anderen Substraten auftritt. Wenn die Mitochondrien aus 12 Stunden altem oder aus älterem Mycel isoliert werden, hemmt Rotenon die endogene NADH-Dehydrogenase bis zu 95% (vergleiche LAMBOWITZ et al. 1972a mit Weiss et al. 1970). Es sei hier noch darauf hingewiesen, daß Citrat immer zusammen mit 2 mM Malat verabreicht wurde, um den Transport in die Mitochondrien durch den Malat-Citrat-Carrier zu ermöglichen. Es wurde jedoch die Beobachtung gemacht, daß bei Mitochondrien aus älterem ($\geq$ 16 Stunden) Mycel eine Malat-Zugabe nicht notwendig war (vgl. E.1.2.1. und E.1.3.1. bzw. E.2.4.3.). Eine Erklärung dafür könnte eine hohe endogene Malat-Konzentration in den Mitochondrien sein, was aber nicht untersucht wurde.

Wegen der günstigen Atmungsaktivitäten und der relativ guten Ausbeute bei der Mitochondrienisolierung wurden für die weitere Experimente Mitochondrien aus etwa 16 Stunden altem Mycel verwendet. Abbildung 2 zeigt

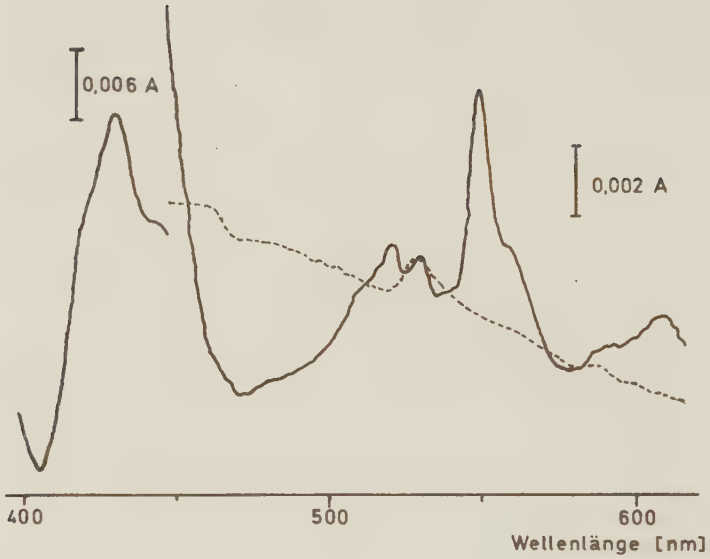


Abb.2 Absorptionsspektrum von Mitochondrien des Neurospora Wildstammes.
Die gestrichelte Linie zeigt die Grundlinie, die durchgezogene das Differenzspektrum von Dithionit-reduzierten minus oxidierten Mitochondrien. Die Mitochondrien wurden aus 16 Stunden altem Mycel isoliert, die Mitochondrienkonzentration betrug 0,3 mg Protein/ml.

ein charakteristisches Spektrum solcher Mitochondrien im sichtbaren Bereich. Das Spektrum ist sehr ähnlich dem tierischer Mitochondrien, nur liegt das Absorptionsmaximum für das kurzwellige Cytochrom b (Cytochrom b-562) bei etwa 559 nm (JAGOW und BOHRER 1975).

E.1.1.2. Wachstum und Änderung der mitochondrialen Eigenschaften mit der Wachstumsphase bei Neurospora crassa poky-Mutante

Abbildung 3 zeigt das Wachstum und die Änderung der spezifischen Atmungsraten der Neurospora poky-Mutante.

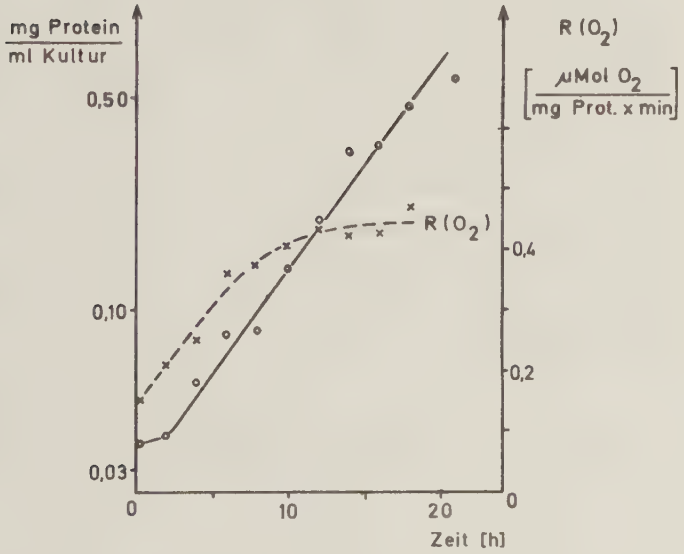


Abb.3 Wachstum und Sauerstoffverbrauch des Mycels der Neurospora crassa poky-Mutante (FGSC #385) in Abhängigkeit von der Zeit.
Die Atmungsraten wurden in Vogel's Minimalmedium mit 2% Glucose bestimmt.

Die stationäre Wachstumsphase wurde im untersuchten Zeitraum nicht erreicht. Die abgebildeten Atmungsraten bedeuten immer totale, ungehemmte Atmungsraten, wobei das Verhältnis der CN^--insensitiven und -sensitiven Atmungskapazitäten sich schon während der logarithmischen Phase zu Gunsten der CN^--sensitiven Atmung leicht verändert. Unter CN^--insensitiver Atmungskapazität wird die Atmungsrate in Anwesenheit von 2mM KCN, unter CN^--sensitiver Atmungskapazität die Atmungsrate in Anwesenheit von 240 µg SHAM/ml bezeichnet. Wenn die CN^--sensitive und CN^--insensitive Atmungskapazitäten in Prozent ausgedrückt sind, entspricht die ungehemmte Atmung 100%. Die Summe der CN^--sensitiven und CN^--insensitiven Atmungskapazitäten ist größer als der ungehemmte Sauerstoffverbrauch, weil in Abwesenheit von Inhibitoren der normalen Atmungskette die Kapazität des CN^--insensitiven Atmungswegs nur teilweise ausgenutzt wird (SOLOMOS 1977).

Während bei 3 Stunden altem Mycel die CN^--unempfindliche Atmung 95-100% der ungehemmten Atmung ausmachen kann, beträgt sie bei 12 Stunden altem Mycel nur noch 87%. Die CN^--sensitive Atmung nimmt in diesem Zeitraum von 35% auf 50% zu. Die Verschiebung des Verhältnisses der beiden Atmungswege ist langsam, aber als Tendenz konsequent zu beobachten.

Die Änderung der Atmungsraten der Mitochondrien mit

verschiedenen Substraten ist bei Succinat und bei endogenem NADH ähnlich wie bei den Mitochondrien des Wildstammes, nur die Aktivitätsabnahme ist weniger ausgeprägt. Die exogene NADH-Oxidase-Aktivität nimmt bei den poky Mitochondrien nicht ab, sondern zeigt in der ersten Hälfte der logarithmischen Phase eine starke Aktivitätszunahme (220 nmol O_2/mg Protein/ min bei Mitochondrien aus 12 Stunden altem Mycel), wie es auch bei Succinat der Fall ist.

Was die Cyanid-Unempfindlichkeit der Mitochondrien (und die Atmungsraten) betrifft, bestätigen die vorliegenden Ergebnisse für Mitochondrien von Mycel aus der logarithmischen Phase die Ergebnisse von LAMBOWITZ et al. (1972). Das Verhältnis von CN^--resistenter zu CN^--sensitiver Atmung mit Succinat als Substrat beträgt 1,1 (0,6), mit exogenem NADH 2,2 (2,0) und mit Citrat 1,0 (0,8). Die Angaben in Klammern beziehen sich auf umgerechnete Ergebnisse von LAMBOWITZ et al. (1972b).

Im Gegensatz zu dem ausgeglichenen Verhältnis der zwei Atmungswege bei Succinat bzw. Citrat als Substrat, überwiegt die CN^--unempfindliche Atmung bei exogenem NADH als Substrat.

Für die weiteren Experimente sind Mitochondrien aus etwa 16 Stunden altem Mycel verwendet worden.

Tabelle 2 faßt die Eigenschaften der für die DBMIB-Hemmungsexperimente (E.3.) verwendeten Mitochondrien des

Substrat	Wildstamm		poky-Stamm			
	Sauerstoff-verbrauch [nmol O_2 / mg Prot.·min]	Mitochondrien-konzentration [mg Protein / ml]	Sauerstoffverbrauch [nmol O_2 / mg Prot.·min]			Mitochondrien-konzentration [mg Protein/ml]
			gesamt (ungehemmt)	CN^--resist. (+2mM KCN)	CN^--sensit. (+240µg/ml SHAM	
20mM Succinat	43,9 ± 3,8	0,57 ± 0,09	42,4 ± 6,5	24,4 ± 3,4	21,3 ± 2,7	0,71 ± 0,08
20mM Succinat + 0,5mM ADP	76,2 ± 4,2	0,57 ± 0,09				
2mM NADH	28,6 ± 2,5	0,69 ± 0,10	77,8 ±10,6	54,6 ±10,6	24,9 ± 2,9	0,72 ± 0,10
2mM NADH + 0,5mM ADP	49,6 ± 7,0	0,69 ± 0,10				
20mM Citrat + 2mM Malat	18,5 ± 2,7	1,28 ± 0,20	17,5	12,5	12,5	0,9

Tabelle 2: Atmungsraten der für die DBMIB-Hemmungsexperimente verwendeten Neurospora-Mitochondrien des Wild- und poky-Stammes.

Die angegebenen Atmungsraten sind arithmetische Mittelwerte ± S.E.M. von 3 - 8 Mitochondrienisolierungen.

Neurospora Wild- und poky- Stammes zusammen. Die angegebenen Atmungsraten sind Durchschittswerte von 3 bis 8 Mitochondrienisolierungen. Die Atmungsraten für Mitochondrien vom Neurospora Wildstamm liegen in Tabelle 2 deutlich niedriger als bei den Mitochondrien aus gleichaltrigem Mycel in Tabelle 1. Der Unterschied ist dadurch zu erklären, daß die zuletzt erwähnten Mitochondrien sofort nach der Isolierung vermessen und nur unmittelbar vor der Atmungsmessung verdünnt wurden, für die DBMIB-Hemmung dagegen wurden Mitochondrien bis zu acht Stunden nach der Isolierung verwendet und in verdünntem Zustand inkubiert. Ein Aktivitätsverlust mit zunehmendem Alter der Mitochondrien ist auch bei der poky-Mutante, insbesondere bei der CN^--unempfindlichen Atmung zu beobachten. Dazu kommt noch, daß die CN^--insensitive Atmung gegenüber der Isolierungsmethode empfindlicher ist als die CN^--sensitive Atmung und daher die Mitochondrien immer weniger CN^--resistent sind als das entsprechende Mycel (SOLOMOS 1977).

Ein typisches Spektrum im sichtbaren Spektralbereich für Mitochondrien der poky-Mutante zeigt Abbildung 4. Auffallend ist der für die CN^--insensitiven Mitochondrien charakteristische hohe Cytochrom c-Gehalt. Obwohl der FGSC #385 Stamm als Cytochrom b- und Cytochrom-Oxidase- defizient beschrieben wurde (GRIFFITHS et al. 1968), gilt dies nur für Mitochondrien aus der frü-

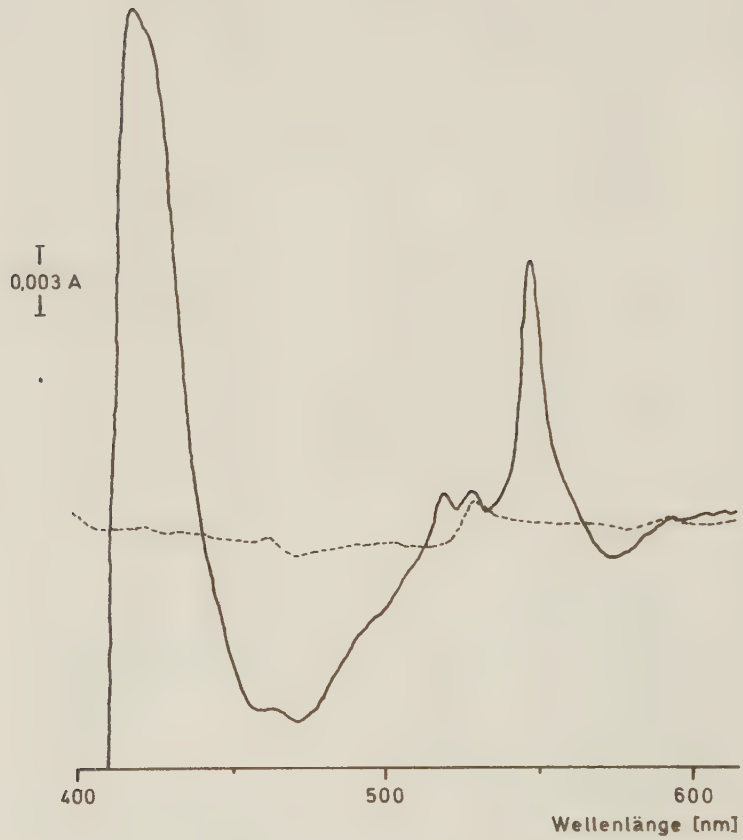


Abb.4 Absorptionsspektrum von Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante.
Die Mitochondrien wurden aus 16 Stunden altem Mycel isoliert, die Mitochondrienkonzentration betrug 0,3 mg Protein/ml. Die gestrichelte Linie zeigt die Grundlinie, die durchgehende Linie das Differenzspektrum von Dithionit-reduzierten minus oxidierten Mitochondrien.

hen log-Phase, und Cytochrom b-560 bei Mitochondrien aus 16 Stunden altem Mycel ist als deutliche Schulter sowohl an der α- als auch bei der γ-Bande von Cytochrom c zu sehen, was die Ergebnisse von HASKINS et al. (1953) und KLEIN et al. (1975) unterstützt. Trotz relativ hoher CN^--sensitiver Atmungsraten ist die "anormale" Cytochrom-Oxidase (Spektren modifiziert, Aktivität nachweisbar, KLEIN et al. 1975) bei Raumtemperatur-Spektren nicht zu beobachten, was darauf hindeutet, daß von den Anomalitäten die spektralen Eigenschaften stärker betroffen werden als die Enzymaktivität.

E.1.2. Arum maculatum

E.1.2.1. Eigenschaften der Arum maculatum Spadix-Mitochondrien

Die totalen und Cyanid-resistenten Atmungsraten für Mitochondrien des Arum maculatum Spadix sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Mitochondrien wurden aus Blüten in γ- und δ-Stadium (JAMES UND BEEVERS 1950) isoliert. Etwas höhere CN^--insensitive Atmungsraten lassen sich bei Mitochondrien aus Blüten im ε-Stadium erzielen, die Blüten in diesem Stadium sind aber empfindlicher gegen Lagerung.

Substrat	Ungehemmte Atmung [nmol $O_2 \cdot$ mg Protein$^{-1} \cdot$ min^{-1}]	CN-resistente Atmung [nmol $O_2 \cdot$ mg Protein$^{-1} \cdot$ min^{-1}]	Protein [mg/ml]
20mM Succinat	132,5 ± 26,3	117,4 ± 23,3	0,56±0,15
2mM NADH	250,2 ± 58,7	205,1 ± 44,9	0,33±0,03
20mM Citrat	63,7 ± 6,3	55,3 ± 5,5	0,62±0,06

Tabelle 3: Atmungsraten von Mitochondrien der Arum maculatum Spadix.

Der Cyanid-unempfindliche Sauerstoffverbrauch wurde in Anwesenheit von 2mM KCN bestimmt.

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 - 6 Experimenten.

Die Mitochondrien haben, nachdem die normale und die alternative Atmung durch KCN und SHAM blockiert wurde, eine endogene Atmung von 9,7 ± 2,6 nmol O_2/mg Protein/min.

Mit Succinat als Substrat wurden die Mitochondrien mindestens fünf Minuten lang inkubiert, um konstante Atmungsraten zu erreichen; Vorinkubation mit 1 mM ATP ergab maximale und konstante Atmungsraten sofort nach Succinat-Zugabe. (s. z.B. BAHR und BONNER 1973a und b, RICH et al. 1977). Bei einigen Präparaten wurde kontrolliert, ob ATP-Zugabe nach Vorinkubation mit Succinat eine zusätzliche Erhöhung der Atmungsrate bewirkt und eine negative Antwort erhalten. Ein stimulierender Effekt

des ATP auf die Succinat-Oxidase-Aktivität auch nach Vorinkubation mit Succinat wie bei RICH et al. (1977) kann aber für die Mehrheit der für die DBMIB-Hemmung verwendeten Präparate nicht ausgeschlossen werden.

Mit Citrat als Substrat ändert die Zugabe von 2 mM Malat die Atmungsgeschwindigkeit nicht, daher wurde Malat aus dem Assay weggelassen. Im Gegensatz zu Neurospora crassa-Mitochondrien ist Malat (10-20 mM) ein gutes Substrat bei Arum Mitochondrien, wurde aber wegen der möglichen Vielfalt der Malat-Dehydrogenasen (PALMER 1976) nicht für die weitere Experimente verwendet. Der interne NADH-Dehydrogenase-Komplex ist bei dem Arum Spadix durch Rotenon und Amytal nicht spezifisch hemmbar. Aber sowohl Rotenon (10 µM) als auch Amytal (10 mM) verursachen eine 30-60 %-ige Hemmung der CN^--insensitiven Atmung bei allen Substraten.

Die in Tabelle 3 charakterisierten Mitochondrien wurden für die DBMIB-Hemmungsexperimente (E.3.1.2.2.) oder für Isolierung von submitochondrialen Partikeln (E.2.2.) verwendet.

E1.3. Arum cornutum

Arum cornutum (alter Name: Sauromatum guttatum) Spadix besitzt eine genauso hohe CN^--insensitive Atmung

wie der Spadix von Arum maculatum (BAHR und BONNER 1973a). Die Rhizome von Arum cornutum sind groß und aus kommerziellen Quellen zu beziehen, relativ einfach zu treiben, und der Spadix ist viel größer (8-10 g/Spadix) als bei Arum maculatum (1-2 g/Spadix). Aus diesen Gründen wurde Arum cornutum anstatt des nahverwandten Arum maculatum in einigen Experimenten verwendet.

E.1.3.1. Eigenschaften der Mitochondrien von Arum cornutum Rhizomen

Mitochondrien aus ruhenden Arum cornutum Rhizomen haben eine normale, CN^-- und Antimycin-sensitive Atmung. Bei einigen Mitochondrienpräparaten wurde auch ein geringer CN^--insensitiver und SHAM-sensitiver Sauerstoffverbrauch beobachtet, der etwa halb so groß war wie die endogene Atmung.

Die Aktivität der Mitochondrien mit verschiedenen Substraten ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Mitochondrien wurden mit Succinat als Substrat 3-5 Minuten lang vorinkubiert, Citrat wurde allein, ohne Malat verabreicht (s. E.1.2.1.). Die Mitochondrien hatten relativ niedrige Atmungsaktivität im Zustand 4 und eine hohe endogene Atmung, was für ruhende Lagerorgane nicht außergewöhnlich ist, und waren gut gekoppelt (R.C. 2.0).

Substrat	Zustand 4 der Atmung	Zustand 3 der Atmung	Endogene Atmung	Protein mg/ml
20mM Succinat	16,6± 2,4	34,0± 4,8	7,0± 1,4	1,3±0,2
2mM NADH	17,0± 1,1	29,2± 2,5	7,3± 1,6	1,2±0,2
20mM Citrat	8,5± 1,4	17,0± 3,3	4,3± 0,5	1,9±0,2

Tabelle 4: Atmungscharakteristika der aus ruhenden Arum cornutum Rhizomen isolierten Mitochondrien.

Der Sauerstoffverbrauch ist in [nmol O_2/mg Protein/min] angegeben; die Aktivität im Zustand 3 der Atmung wurde in Anwesenheit von 1mM ADP gemessen (CHANCE und WILLIAMS, 1956).

Die Werte sind Mittelwerte aus 10 - 11 Experimenten.

Die Mitochondrien aus Arum cornutum Rhizomen wurden für DBMIB-Hemmungsexperimente verwendet (E.3.1.1.2. und E.3.2.1.1.1.).

E.1.3.2. Cyanid-insensitive Atmung bei Arum cornutum auch außerhalb des Spadix

Mitochondrien des Arum cornutum Spadix zeigten hohe

CN^--insensitive Atmung (70-80%), konnten jedoch für weitere Experimente nicht verwendet werden, weil nur 20 -30% der Pflanzen eine gesunde Blüte entwickelt hatten.

Es wurde untersucht, ob andere oberirdische Teile der Pflanzen außer dem Spadix, wie z.B. Blattansätze und Hüllblätter CN^--insensitive Atmung besitzen.

CN^--unempfindliche Atmung von 40 - 80% wurde bei den oberirdischen Pflanzenteilen gefunden (Abbildung 5), unabhängig davon, ob die Rhizome im Dunkeln oder im Licht getrieben waren. Die Rhizome derselben Pflanzen waren 90-100%ig Cyanid-empfindlich. Die Mitochondrien der im Licht getriebenen Pflanzen waren sichtbar mit grünem Material verunreinigt; aufgrund der niedrigen Atmungsraten muß eine Verunreinigung auch bei den anderen ("dunkeln") Mitochondrien angenommen werden.

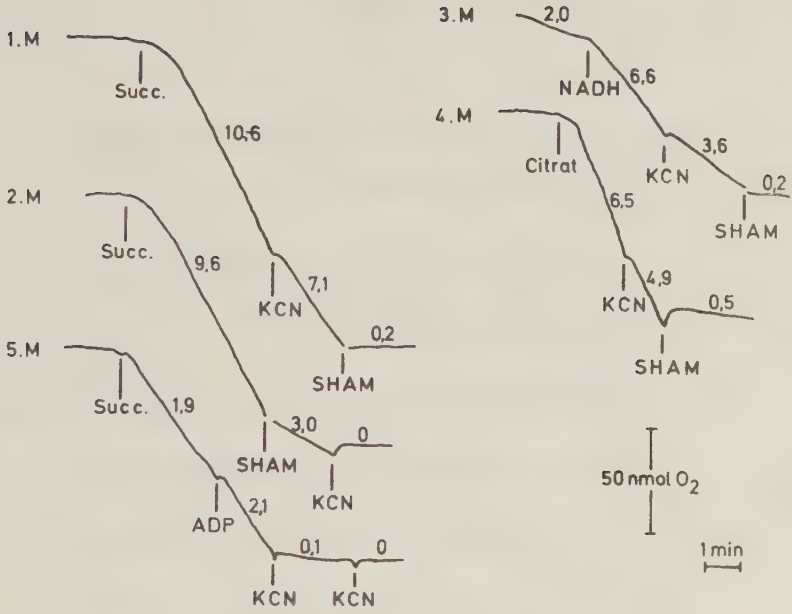


Abb. 5 Cyanid-unempfindliche Atmung in den oberirdischen Teilen der treibenden Arum cornutum Pflanze.

Die Mitochondrien (M) wurden aus Blattansätzen und Hüllblättern (Kurven 1-4) bzw. Rhizomen (Kurve 5) von in feuchter Holzwolle im Dunkeln getriebenen Pflanzen isoliert. Die Zahlen geben Sauerstoffverbrauchsraten in [nmol O_2/min/mg mitochondriales Protein] an. Die Mitochondrienkonzentration betrug 2,5 mg Protein/ml bei Kurve 1-3, 5,0 mg Protein/ml bei Kurve 4 und 5,8 mg Protein/ml bei Kurve 5.

E.2. Neue methodische Ansätze

E.2.1. Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung durch Belichtung beim Neurospora Wildstamm

Cyanid-resistente Atmung kann in Cyanid-sensitiven Organismen durch Hemmung der normalen Atmungskette induziert werden (LAMBOWITZ und SLAYMAN 1971). Es wurde untersucht ob Belichtung, möglicherweise durch Hemmung der Cytochrome-Oxidase (NINNEMANN et al. 1970), bei dem CN^--sensitiven Wildstamm von Neurospora crassa die Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung bewirken könnte. Durch Belichtung mit 400-900 W/m^2 (Beleuchtungsstärke vor dem Kulturgefäß, hinter dem Kulturgefäß etwa um eine Größenordnung niedriger) ist es möglich, in Kulturen vom Neurospora Wildstamm CN^--insensitive Atmung zu induzieren (Abb. 6). Für den CN^--insensitiven Sauerstoffverbrauch des Mycels ist die entsprechende mitochondriale Atmung verantwortlich (Abb. 6B).

Die CN^--insensitive Atmung erschien nicht sofort mit der Belichtung, sondern zeigte eine Verzögerung von 2-4 Stunden. Die Notwendigkeit der Induktionsperiode deutet darauf hin, daß für das Auftreten der CN^--insensitiven Atmung eine Proteinneusynthese notwendig

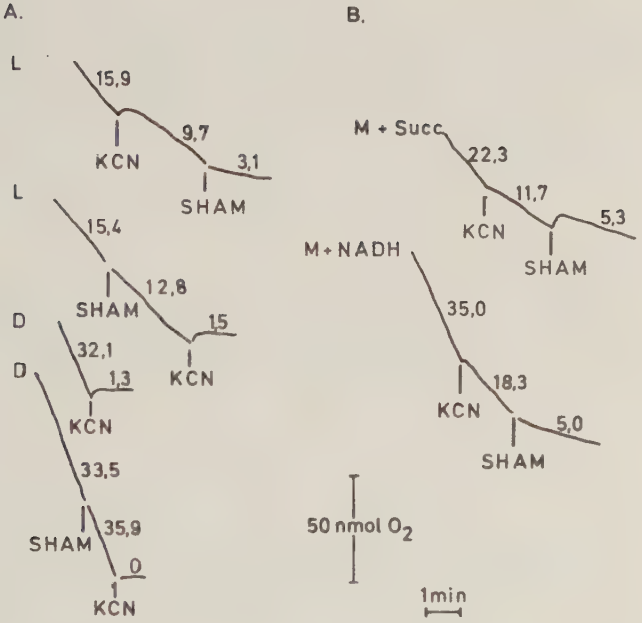


Abb.6 Cyanid-unempfindliche Atmung in Mycel (A) und Mitochondrien (B) des Licht-induzierten Neurospora Wildstammes.

Die Kulturen wurden zwei Stunden nach dem Animpfen für 8 Stunden mit Weißlicht (450 W/m^2 vor und 45 W/m^2 hinter dem Kulturgefäß gemessen) belichtet. Die Sauerstoffverbrauchsraten des belichteten Mycels (L) bzw. der Dunkelkontrollen (D) sind in nmol O_2/min/ml Kultur angegeben. Der Sauerstoffverbrauch der (ungewaschenen) Mitochondrien (M) aus dem gleichen belichten Mycel ist in nmol O_2/min/200 µl Mitochondrien angegeben.

war (EDWARDS und ROSENBERG 1976). Die CN^--Unempfindlichkeit erreichte ihr Maximum etwa 8 Stunden nach Beginn

der Belichtung und klang allmählich ab. Wenn die Belichtung abgebrochen wurde, fing die CN^--Unempfindlichkeit sofort an abzunehmen. Die Lichtinduktion war nur bei 2-6 Stunden alten Kulturen erfolgreich, bei 10 Stunden alten Kulturen hatte das Licht keine induzierende Wirkung mehr. Es ist unklar, ob die Nicht-Induzierbarkeit eine physiologische Ursache hat (vgl. mit der Antimycin-Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung bei LAMBOWITZ und SLAYMAN 1971), oder einfach auf einem schützenden Effekt der Carotinoide oder auf der höheren Myceldichte beruht.

Die verwendeten hohen Lichtintensitäten verursachten eine Wachstumshemmung, wobei die Wachstumshemmung auch eine Folge der Erwärmung (7-12 °C) oder der Belichtung und Erwärmung sein könnte. Temperaturen über 40 °C können die Keimung der Konidien vollständig verhindern. Ein Wärmeeffekt bei der Induktion der CN^--unempfindlichen Atmung ist ebenfalls nicht ganz auszuschließen, obwohl die vollständige CN^--Empfindlichkeit von bei 37 °C gezüchteten Neurospora-Wildstamm-Kulturen dagegen spricht.

Belichtungsexperimente (mit eventuell niedrigeren Beleuchtungsstärke) mit ausgehungertem Mycel konnten nicht durchgeführt werden, weil durch das Hungern die Atmungskapazität nahezu vollständig verloren ging und die Zellen extern zugegebene Substrate (Glucose oder Succinat) zuerst überhaupt nicht veratmen konnten. Erst

nach Inkubation über mehreren Stunden in Medium mit Substrat erschien ein zunehmender Sauerstoff-Verbrauch (bei der poky-Mutante, die Cyanid-sensitive und CN^--resistente Atmung hat, war das Verhältnis der beiden Atmungswege nach Inkubation mit Substrat interessanterweise gleich groß wie es vor dem Hungern war).

E.2.2. Cyanid-insensitive submitochondriale Partikel aus Mitochondrien von Arum Spadix

Versuche, Cyanid-unempfindliche submitochondriale Partikel aus Mitochondrien durch Ultraschall- oder Detergenz-Behandlung zu isolieren sind fehlgeschlagen, weil während der Isolierung die Cyanid-unempfindliche und SHAM-empfindliche Atmung verloren ging.

Nach der Methode von CRANE et al. (1956) ist es möglich, durch milden pH-Schock (pH=8,5) relativ schonend gute submitochondriale Partikel zu gewinnen. Ein zusätzlicher Vorteil der Methode besteht darin, daß fast 90% der SMP mit der Innenseite nach außen gekehrt sind (nach Ultraschallbehandlung sind es etwa 60%). Das hohe pH kann die Succinat-Dehydrogenase solubilisieren was, abhängig vom Ziel des Experiments, von Vor- oder Nachteil sein kann.

Mit der obigen Methode konnten erfolgreich submitochondriale Partikel mit hoher CN^--insensitiver

Atmung aus Mitochondrien des Arum-Spadix isoliert werden. Die Succinat-Dehydrogenase konnte durch Hinzufügen von 2 mM Malonat zum Isolationsmedium vor der Solubilisation geschützt werden.

Die Ausbeute der Isolierung ist in Tabelle 5 zusammengefasst, die spezifischen Aktivitäten der SMP eines typischen Experiments sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Ausbeute beträgt sowohl für Protein als auch für die NADH- und Succinat-Oxidase-Aktivität 15%. Im Vergleich zu intakten Mitochondrien sind SMP weniger CN^--insensitiv und haben eine höhere endogene Atmung. Bei Isolierungen in Abwesenheit von Malonat war die Succinat-Oxidase-Aktivität kaum messbar, aber die Cyanid-unempfindliche NADH-Oxidase-Aktivität blieb unverändert.

Wie Tabelle 6 zeigt, entspricht die spezifische Aktivität der SMP I-Fraktion der Aktivität vor der Isolierung, die Aktivität der SMP II-Fraktion liegt etwas niedriger (Bei einigen Isolierungen wurden 2-3 fach größere Oxidase-Aktivitäten in den SMP erreicht als im Ausgangsmaterial, aber eine Anreicherung der Oxidase-Aktivität während der Isolierung kann als Ausnahme angesehen werden). Im Vergleich zu Tabelle 3 (Sauerstoffverbrauch von frischen, intakten Mitochondrien) liegen die Atmungsaktivitäten der SMP I-Fraktion sogar 2,5-4-fach niedriger. Dieser Aktivitätsverlust ist Folge des Einfrierens und Lagerns der Mitochondrien, obwohl die Mitochondrien in flüssigen Luft eingefroren und gelagert

	Protein	NADH-Oxidase Aktivität			Succinat-Oxidase Aktivität		
		ungehemmt	CN-resistent	CN-sensitiv	ungehemmt	CN-resistent	CN-sensitiv
SMP I	8,5%	9,0%	7,0%	17,0%	10,6%	4,2%	13,0%
SMP II	6,9%	5,0%	4,0%	12,0%	3,5%	3,8%	5,8%
insgesamt	15%	14%	11%	29%	14%	8%	19%

Tabelle 5: Ausbeute der Isolierung von submitochondrialen Partikeln aus Mitochondrien des Arum Spadix in Prozent vom Ausgangsproteingehalt und der Gesamtatmungsaktivität vor der Isolierung.

SMP-I bezeichnet die Fraktion der submitochondrialen Partikel nach der ersten, SMP-II nach der zweiten Extraktion.

	Spezifische NADH-Oxidase-Aktivität		Spezifische Succinat-Oxidase-Aktivität	
	$\left[\frac{\text{nmol } O_2}{\text{mg Prot.} \cdot \text{min}}\right]$	% der Ausgangs-aktivität	$\left[\frac{\text{nmol } O_2}{\text{mg Prot.} \cdot \text{min}}\right]$	% der Ausgangs-aktivität
SMP I	97,2	105	34,7	109
SMP II	66,4	72	16,1	51

Tabelle 6: Spezifische Aktivität von Arum Spadix SMP mit 2mM NADH oder mit 15mM Succinat als Substrat.

Als Ausgangsaktivität (100%) wurde die Sauerstoffverbrauchsrate der gelagerten Mitochondrien unmittelbar vor der SMP-Isolierung bezeichnet.

wurden. Besonders empfindlich ist die Succinat-Oxidase-Aktivität, wobei bemerkt werden muß, daß eine Aktivierung der Succinat-Dehydrogenase durch ATP-Zugabe zum Ausgangsmaterial und zu den SMP nicht versucht wurde.

Wegen des großen Aktivitätsverlusts beim Einfrieren und Lagern der Mitochondrien ist es dringend geboten, die submitochondrialen Partikeln aus frischen Mitochondrien zu isolieren.

E.2.3. Zwei Cytochrom c-Spezies in Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora

In Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora ist die Cytochrom c-Konzentration im Vergleich zu Wildstamm-Mitochondrien stark erhöht (vgl. Abb.2 und 4), und der Redoxzustand des Cytochrom c kann durch die Aktivität des Cyanid-insensitiven Atmungsweges beeinflußt werden (RICH und BONNER 1977), was eine direkte oder regulatorische Wechselwirkung zwischen Cytochrom c und der alternativen Atmungskette vermuten ließ.

SCOTT und MITCHELL (1969) isolierten zwei Cytochrom c-Spezies aus Mycel von Neurospora poky-Mutante und Wildstamm, konnten aber in Mitochondrien nur das während des Wachstums später auftretende Cytochrom c_I

nachweisen.

Bei schonender Mitochondrienisolierung war es möglich, aus Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante nach der Methode von SCOTT und MITCHELL (1969) sowohl Cytochrom c_I als auch Cytochrom c_{II} zu isolieren. Abbildung 7 zeigt das Elutionsprofil der zwei Cytochrom c-Spezies eines Mycelextrakts und eines Mitochondrienextrakts aus einer 19 Stunden alten Neurospora FGSC#385 Kultur. Das Verhältnis von Cytochrom c_I und c_{II} ist in beiden Fällen gleich; den Leitfähigkeitsbestimmung entsprechend eluiert Cytochrom c_I bei einer Konzentration von 0,26 M NaCl (Peak-Fraktion), Cytochrom c_{II} bei 0,30 M NaCl. Diese Werte stimmen gut mit den Ergebnisse (0,275 bzw. 0,290 M) bei SCOTT und MITCHELL 1969 überein. Es sei jedoch erwähnt, daß bei anderen Säulen- und Gradienten-Volumen eine leichte Verschiebung der beiden Maxima möglich ist.

Raumtemperatur war für die chromatographische Trennung der zwei Cytochrom c-Spezies essentiell, bei 4 ^{o}C erfolgte keine Trennung.

Das Experiment ist insofern beschränkt aussagekräftig, als die Cytochrom c-Extraktion nur einmal aus einer Mitochondrienpräparation durchgeführt wurde. Eine Rechromatographie des Mitochondrienextrakts führte jedoch zur gleichen Trennung von Cytochrom c_I und c_{II}.

Außer Cytochrom c konnten in den Fraktionen keine anderen Cytochrome nachgewiesen werden.

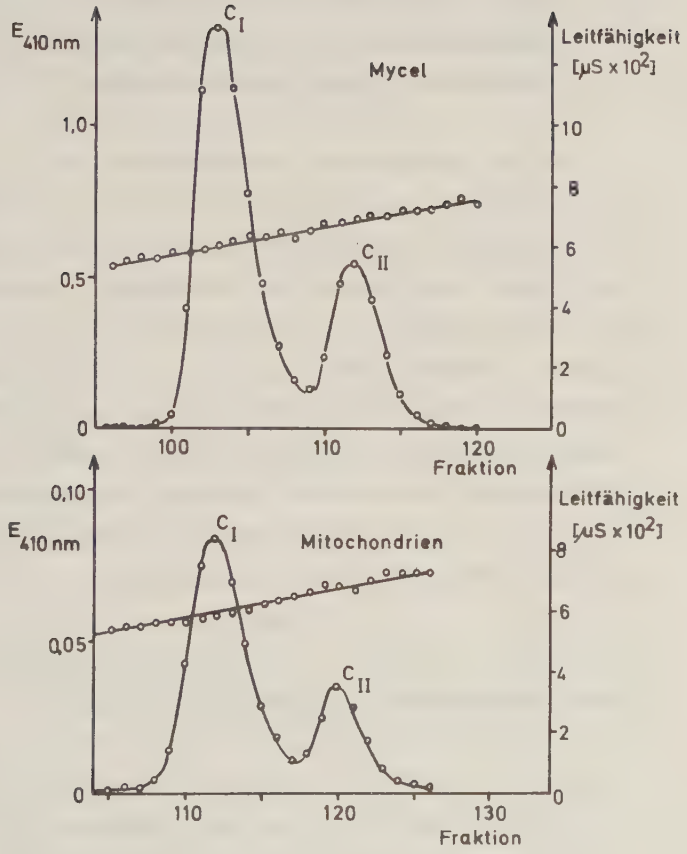


Abb.7 Elutionsprofil von Cytochrom c aus Mycel und Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante nach der zweiten Amberlite CG 50 II Säule.

Das Säulenvolumen betrug 15 ml, das Fraktionsvolumen betrug 1 ml. Die Elution erfolgte bei Zimmertemperatur. Die Extinktion der Fraktionen wurde nach Dithionit-Zugabe bei 410nm gemessen. Die Leitfähigkeit wurde nach 11-facher Verdünnung der Fraktionen vermessen.

E.2.4. Möglichkeiten der Einführung Cyanid-unempfindlicher Protoplasten und steriler Gewebekulturen als Untersuchungsobjekt

Die für Cyanid-unempfindliche Organismen charakteristische Metabolismuswege und die Wirkungsweise der Faktoren, die bei höheren Pflanzen Cyanid-unempfindliche Atmung induzieren können, sind mangels geeigneter Untersuchungssysteme weitgehend unbekannt (s. S.10 und D.2.4.). In ganzen Organen oder in Gewebescheiben werden Experimente durch Diffusionsprobleme erschwert, zellfreie Homogenate sind kurzlebig. Es wurde versucht, durch Einführung von besser kontrollierbaren Zellsystemen, wie Cyanid-unempfindliche Protoplasten und Gewebekulturen, günstigere Untersuchungssyteme zu etablieren.

E.2.4.1. Protoplasten aus Arum maculatum Spadix

Die bei M.1.2.2. beschriebene Methode führte zur Isolierung von guten Protoplasten aus dem Spadix von Arum maculatum. Die Ausbeute war hoch und die Protoplasten überlebten gut 12 Stunden nach der Isolierung. Eine längere sterile Anzucht mit möglicher Kallusbildung wurde nicht versucht.

Der Sauerstoffverbrauch der Protoplasten wurde vermessen. Die Protoplasten zeigten eine relativ hohe

Atmung mit endogenen Substraten (13 nmol O_2/min/5x10^5 Zellen), Zugabe von Saccharose (5mM) verursachte eine 1,5-fache, 50 mM Succinat eine etwa dreifache Stimulierung des Sauerstoffverbrauchs. Malonat (50mM) hemmte die Atmung bis zu 80% sowohl mit endogenen Substraten als auch mit Saccharose und Succinat. Die Malonat-Hemmung der Atmung mit endogenen Substraten deutet darauf hin, daß in der Zelle, trotz der hohen Aktivität der externen NADH-Oxidase in den Mitochondrien überwiegend Citrat-Zyklus Substrate veratmet werden. Myristinsäure in Konzentrationen von 0,5-1,5 mM konnte von den Protoplasten nicht als Substrat für die Atmung verwendet werden, sondern bewirkte vielmehr eine Hemmung des Sauerstoffverbrauchs (um 40-80%).

Die Atmung der Protoplasten war überwiegend Cyanid-unempfindlich: durch 3mM SHAM wurden 80-90% des Sauerstoffverbrauchs gehemmt, CN^--sensitiv war etwa 20% der Atmung. Cyanid verursachte eine leichte Stimulierung der endogene Atmung. Das Verhältnis der beiden Atmungswegen entsprach dem Verhaltnis, das in frischem, zellfreiem Homogenat gemessen wurde.

E.2.4.2. Das Fehlen der Kallusbildung bei Gewebekultur von Arum maculatum

Keine der bei M.1.2.3. beschriebenen Medien- oder

Wachstumshormon-Kombinationen hat bei Auspflanzen von Organen von Arum maculatum zu Kallusbildung geführt, obwohl das Gautheret-Medium (GAUTHERET 1949), kombiniert mit frischer Kokosmilch, bei einer anderen Araceen-Pflanze (bei Amorphophallus) erfolgreich verwendet wurde (MOREL und WETMORE 1950).

Die Blütenteile wie Spadix, Haare und Stempel nahmen am Anfang der Kultivierung unabhängig von der Art des Mediums an Größe zu. Aus dem Stempel entwickelten sich grüne, dann sterile rote Früchte in einer für die Arum maculatum-Pflanze etwa charakteristischen Größe.

Es ist unklar, ob das Medium oder eine bereits irreversible Differenzierung in der Blüte die Ursache der fehlenden Kallusbildung war.

E.2.4.3. Cyanid-unempfindliche Atmung in Kartoffel-Gewebekulturen

Wachstumskurve und Änderung in der Atmung

Frische Gewebeschnitte von unbehandelten Knollen der Kartoffelpflanze (Solanum tuberosum L.) bzw. daraus isolierte Mitochondrien haben normale, Cyanid-sensitive Atmung (HACKETT et al. 1960, DIZENGREMEL und LANCE 1976). Der alternative, Cyanid-unempfindliche Atmungsweg

läßt sich jedoch auf verschiedene Art induzieren, und die induzierte Cyanid-unempfindliche Atmungskapazität kann 60-80% der ungehemmten Atmung ausmachen.

Die Induzierbarkeit des alternativen Atmungswegs ist von der Induktionsmethode, der Kartoffel-Sorte und vom Entwicklungszustand bzw. der Lagerzeit der Kartoffelknollen abhängig, und die durch die Induktion hervorgerufenen Änderungen des Metabolismus sind unterschiedlich (LEE und CHASSON 1966, VAN DER PLAS et al. 1976, SOLOMOS und LATIES 1975, 1976, CHIN und FRENKEL 1977, FRENKEL et al. 1978, DAY et al. 1978, RYCHTER et al. 1979, JANES und WIEST 1979).

Es wurde versucht, durch Einführen einer kontinuierlich wachsenden, Cyanid-resistenten Kartoffel-Gewebekultur den komplexen Induktionsvorgang zu vermeiden und für die Untersuchung des Metabolismus von Cyanidunempfindlichen höheren Pflanzen ein geeigneteres System zu etablieren.

Die Flüssigkeitskultur des dihaploiden (2n=24) Kartoffelklons (HH 258) besitzt ohne zusätzliche Induktion eine zu 50-90% Cyanid-unempfindliche Atmung. Die Wachstumskurve und der ungehemmte Sauerstoffverbrauch der Kultur sind in Abbildung 8 dargestellt; Abbildung 9 zeigt die Änderung der CN^--insensitiven Atmungskapazität mit dem Kulturalter.

Die Gesamtatmung der Zellen nimmt in der

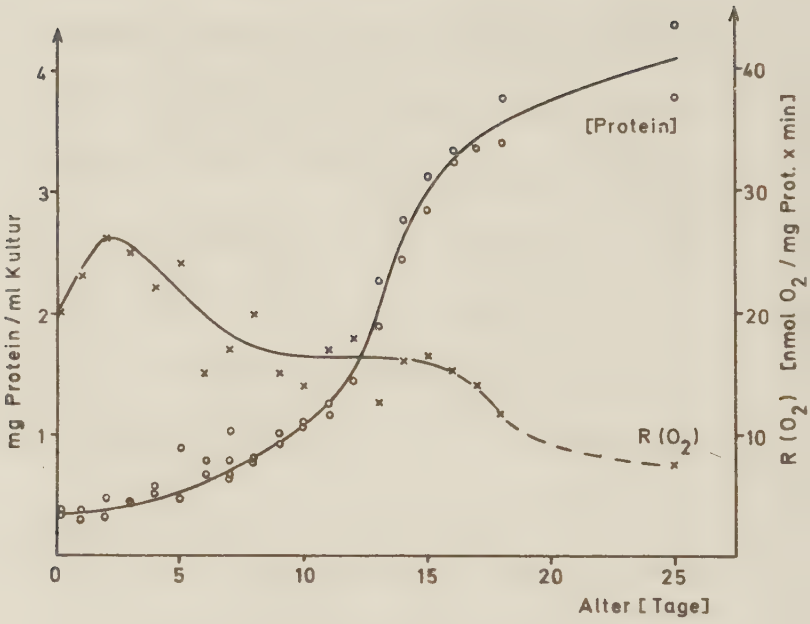


Abb.8 Wachstumskurve und Sauerstoffverbrauch der Gewebekultur des HH 258 Kartoffelklons. Der Sauerstoffverbrauch wurde im Kulturmedium (mit 30 g/l Saccharose als Substrat) ohne Inhibitorzugabe gemessen.

prälogarithmischen Phase in den ersten 2-3 Tagen nach dem Animpfen zu, dann langsam ab, und bleibt in der logarithmischen Phase ungefähr konstant. In der stationären Phase ist ein Rückgang des Sauerstoffverbrauches zu beobachten.

Die Cyanid-sensitive Atmungskapazität (der Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von 1,5-3,0 mM SHAM)

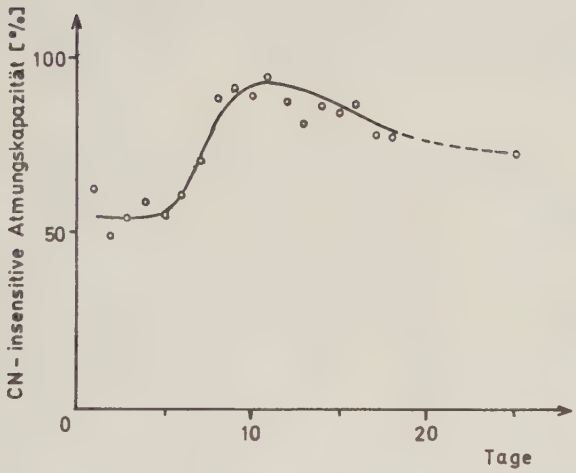


Abb.9 Änderungen des Anteils CN^--insensitiver Atmung während des Wachstums der Gewebekultur des HH 258 Kartoffelklons.
Die Ordinate zeigt die CN^--insensitive Atmungskapazität (d.h. den Sauerstoffverbrauch der Zellen nach Zugabe von 2mM KCN) in Prozent der ungehemmten Atmung. Der Sauerstoffverbrauch wurde im Kulturmedium (mit 30 g/l Saccharose als Substrat) bestimmt.

bildet während der verschiedenen Wachstumsphasen einen konstanten Anteil der ungehemmten Atmung (60-70%). Die CN^--insensitive Atmungskapazität dagegen (gemessen in Anwesenheit von 1,5-3,0mM KCN), ändert sich in der in Abbildung 9 gezeigten Weise und ist maximal und nahezu konstant in der logarithmischen Phase.

Die Zugabe von Cyanid in einer Konzentration von

1-3 mM verursacht keine oder nur eine geringe Stimulierung der Zellatmung. Eine größere Stimulierung als 30% wurde nicht gemessen (bei ganzen Knollen oder bei Kartoffelscheiben stimuliert Cyanid die Atmung: s. Übersichtsartikel von SOLOMOS 1977).

Der Cyanid-unempfindliche Sauerstoffverbrauch der Gewebekultur ist eindeutig mitochondrialen Ursprungs (Tabelle 7).

Die aus der Gewebekultur isolierten Mitochondrien besitzen mit Literaturwerten (RYCHTER et al. 1979) gut vergleichbare Atmungsaktivität, zeigen aber - außer in der Stationär-Phase - keinen erhöhten Sauerstoffverbrauch nach ADP-Zugabe. Das Fehlen(?) der respiratorischen Kontrolle wird nicht durch das intensive Homogenisieren der Zellen verursacht, weil die aus Protoplasten durch osmotischen Schock isolierten Mitochondrien sich genauso verhalten.

Eine Mitochondrienisolierung aus Protoplasten wäre dann von Vorteil, wenn Mitochondrien aus einer in der Stationär-Phase befindlichen Kultur isoliert werden müßten, weil man in dieser Weise 2-4 fach höhere Aktivitäten als die in Tabelle 7 angegebenen erreichen könnte. Die niedrige Aktivität der während der stationären Phase isolierten Mitochhondrien könnte durch eine sekundäre Schädigung während der Isolierung verursacht sein, weil die Zellen in dieser Wachstumsphase sehr

Substrat	Wachstumsphase					
	Lag-Phase (7.Tag)		Logarithm. Phase (14. Tag)		Stationäre Phase (19.-22.Tag)	
	Aktivität [nmol / mg·min]	Anteil [%]	Aktivität [nmol / mg·min]	Anteil [%]	Aktivität [nmol / mg·min]	Anteil [%]
2mM NADH						
Ungehemmte Atmung	50,7		48,6		23,9	
CN-resist. Atmung (+1,5mM KCN)		49		63		49
CN-sensit. Atmung (+1,5mM SHAM)		43		40		78
20 mM Succinat						
Ungehemmte Atmung	24,0		26,9		13,4	
CN-resist. Atmung (+1,5mM KCN)		72		76		47
CN-sensit. Atmung (+1,5mM SHAM)		54		58		79
20 mM Citrat						
Ungehemmte Atmung	11,6		12,9		7,0	
CN-resist. Atmung (+1,5mM KCN)		80		88		40
CN-sensit. Atmung (+1,5mM SHAM)		72		74		90

Tabelle 7: Atmungseigenschaften von Kartoffelmitochondrien aus einer Gewebekultur des HH 258 Klons.
Die Sauerstoffverbrauchsraten sind in [nmol O_2/min/mg Protein] angegeben, Cyanid-unempfindliche Atmung wurde in Anwesenheit von 1,5 mM KCN, die Cyanid-empfindliche Atmung in Anwesenheit von 1,5mM SHAM bestimmt. Wenn Succinat als Substrat verwendet wurde, wurde die Succinat-Dehydrogenase durch Zugabe von 1mM ATP aktiviert.

viele Polyphenoloxidasen und Peroxidasen enthalten.

Der Befund, daß der Sauerstoffverbrauch durch ADP-Zugabe nicht erhöht werden konnte, muß nicht in jedem Fall bedeuten, daß die Mitochondrien keine oxidative Phosphorylierung haben. RYCHTER et al. (1979) fanden niedrige ADP/O Verhältnisse oder gar keine Atmungsstimulierung durch ADP; sie konnten unabhängig davon ein ATP/O Verhältnis von 1,8 in denselben Mitochondrien nachweisen. In diese Richtung zeigen auch die Ergebnisse von HACKETT et al. (1960) bei frischen und gealterten Kartoffelscheiben. Die unveränderten Atmungsraten mit- und ohne ADP-Zugabe wären dadurch erklärbar, daß der alternative Atmungsweg an der State 4-Atmung (in Abwesenheit von ADP) in einem weit größeren Maß teilnimmt als an der State 3 Respiration. Der Elektronenfluss durch die Cytochrom-Kette ist wiederum maximal im State 3, in dem die alternative Oxidase nur die nach maximaler Auslastung der Cytochrom-Kette übrigen Elektronen auf Sauerstoff übertragen kann (BAHR und BONNER 1973a und b).

Die Kartoffelmitochondrien aus der Gewebekultur hatten hohe (25-30 nmol O_2/min/mg Protein) CN^--insensitive exogene NADH-Oxidase Aktivität. Insofern ist es interessant, daß in einigen Fällen berichtet wurde, daß Cyanid-insensitive Kartoffelmitochondrien exogenes NADH nur durch die Cytochrom-Kette oxidieren können (TOMLINSON und MORELAND 1975, DIZENGREMEL 1975, VAN DER PLAS und VERLEUR 1976).

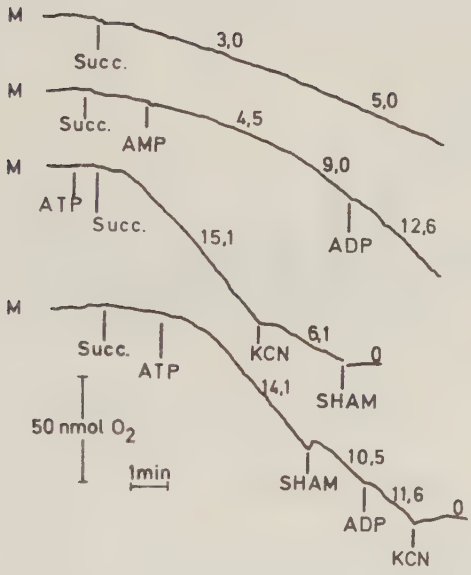


Abb.10 Succinat-Oxidase Aktivität der Kartoffel-mitochondrien.
Die Mitochondrien wurden aus einer HH 258 Gewebekultur in der stationären Phase isoliert. Die Konzentration von AMP, ADP und ATP betrug 1mM, die Succinat-Konzentration 20mM und die KCN und SHAM-Konzentration 1,5mM. Die Sauerstoffverbrauchsraten sind in [nmol O_2/min/mg Protein] angegeben. Die Mitochondrienkonzentration in der Küvette betrug 1,4mg Protein/ml.

Bei den Mitochondrien der Kartoffel-Gewebekultur war es nicht möglich, die Succinat-Dehydrogenase allein durch Inkubation mit Substrat zu aktivieren, sondern für die Aktivierung mußte auch ATP zugeführt werden. ADP

und AMP konnten das ATP teilweise ersetzen, aber die maximale Succinat-Oxidase-Aktivität wurde in diesem Fall etwas später erreicht (Abb.10).

Bei der Gewebekultur des dihaploiden Kartoffelklons war die Cyanid-unempfindliche Atmung in allen Wachstumsphasen ohne zusätzliche Induktion vorhanden. Es blieb jedoch unklar, was die hohe Cyanid-Unempfindlichkeit auslöste. In den nachfolgenden Experimenten wurde versucht, durch Veränderung der Substrat- und Stickstoffquelle bzw. des Wuchsstoffgehalts des Mediums das Verhältnis der zwei Atmungswege zu verschieben, um experimentelle Anhaltspunkte über die Natur des "Induktors" der Cyanid-unempfindlichen Atmung zu gewinnen.

In keinem der Medien war es möglich, den CN^--insensitiven Atmungsweg auszuschalten oder deutlich herabzusetzen. Der Einfluß der verschiedenen Medien auf das Wachstum und auf den Sauerstoffverbrauch der Kultur ist in Abbildung 11 dargestellt.

Die proteinbezogenen ungehemmten Sauerstoffverbrauchsraten waren mit Ammonium als alleiniger Stickstoffquelle herabgesetzt und blieben sonst unverändert. Die starke Wachstumshemmung in Anwesenheit von NH_4Cl wurde wahrscheinlich durch die Chloridionen verursacht, denn wenn Ammonium in Form von $(NH_4)_2HPO_4$ angeboten

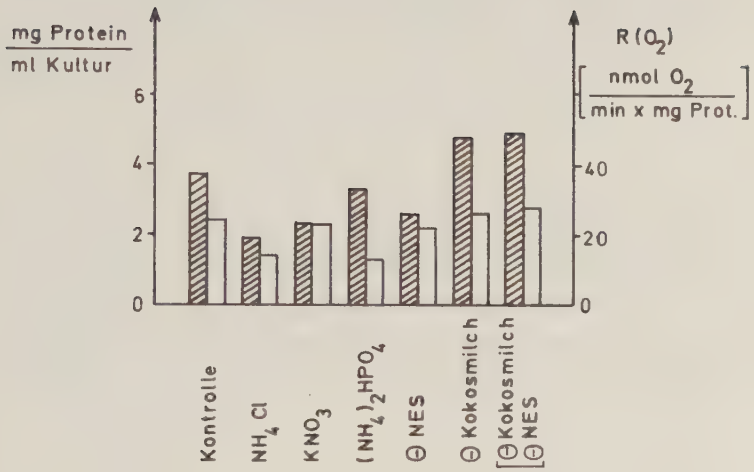


Abb.11 Einfluß der Medienzusammensetzung auf Wachstum und Sauerstoffverbrauch der Kartoffel-Gewebekultur HH 258.
Beim Variieren der Stickstoffquelle wurde die normale Stickstoffquelle (NH_4NO_3 plus KNO_3) des Grundmediums durch NH_4Cl, KNO_3 oder $(NH_4)_2HPO_4$ bei unveränderter Stickstoff-Konzentration (0.06 g atom/l) ersetzt. In den übrigen Fällen wurde die jeweils angegebene Komponente aus dem Grundmedium ausgelassen. Nach 8-tägiger Anzucht wurden die Protein-konzentration (schraffierte Säulen) und die ungehemmte Sauerstoffverbrauchsraten (nicht-schraffierte Säulen) der Kulturen bestimmt. Der Sauerstoffverbrauch wurde im jeweiligen Kultur-medium mit 30 g/l Saccharose als C-Quelle bestimmt.

wurde, entsprach das Wachstum der Kultur etwa dem der Kontrolle. Interessanterweise verursacht die Abwesenheit von α-Naphtylessigsäure nur eine geringe (25 -30%ige)

Wachstumshemmung, was darauf hindeutet, daß die Zellen wenigstens teilweise Auxin-autotroph sind (eine andere mögliche Erklärung wäre, daß beim Animpfen eine für 8 Tage Wachstum ausreichende Menge von α-NES aus der alten Kultur übertragen wird).

Die Abwesenheit von Kokosmilch stimulierte das Wachstum, auch in Abwesenheit von α-NES. Es konnte nicht geklärt werden ob die Kokosmilch das Wachstum direkt beeinflußt, oder, ob die erhöhten Wachstumsraten nur dadurch zustande kommen, daß in Abwesenheit von Kokosmilch die Sauerstoffkonzentration der Kulturen niedriger liegt.

In den bisherigen Kapiteln (E.1 und E.2.) wurden die von mir verwendeten bzw. möglichen neuen Untersuchungssysteme charakterisiert. In dem folgenden Teil der vorliegenden Arbeit werden Experimente beschrieben, die zur Klärung der Rolle des Ubichinons am Verzweigungspunkt der CN^--sensitiven und CN^--insensitiven Atmungswege beitragen sollten.

E.3. Wechselwirkung zwischen Dibromothymochinon und der Elektrontransportkette der Mitochondrien

E.3.1. Dibromothymochinon als Inhibitor der mitochondrialen Atmung

Dibromothymochinon (DBMIB) wurde bei Mitochondrien als Hemmstoff des Elektronentransports bei Ubichinon eingeführt (LOSCHEN und AZZI 1974, MELANDRI et al. 1974). Bei Beginn meiner Arbeit war die Rolle und Bedeutung des Ubichinons in der alternativen Atmungskette noch nicht geklärt.

Als spezifische Inhibitoren der Cyanid-insensitiven Atmung waren nur Hydroxamsäure-Derivate bekannt, die die Endoxidase hemmen sollten (SCHONBAUM et al. 1971). Einige experimentelle Hinweise deuteten aber darauf hin, daß die Cyanid-insensitive Atmungskette nach dem Ubichinon mindestens noch zwei Komponenten besitzt (STOREY 1976, SOLOMOS 1977). Obwohl die Hydroxamsäure-Derivate in isolierten Mitochondrien meistens spezifisch die Cyanid-unempfindliche Atmung hemmen, können sie sowohl verschiedene andere isolierte Enzyme (RICH et al.1978) als auch den Cyanid-sensitiven Elektronentransport in Kartoffelmitochondrien inhibieren (SOLOMOS 1977, RICH 1978).

Die Einführung von DBMIB als Hemmstoff des Elek-

trontransports von Pflanzenmitochondrien sollte einerseits zur Klärung der Rolle des Ubichinons in der alternativen Atmungskette beitragen, andererseits eventuell als neuer Hemmstoff am Verzweigungspunkt der alternativen Atmungskette dienen: Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die DBMIB-Wirkung auf die Cyanid-unempfindliche Atmung nicht bekannt. Seither haben LUKÁCS und NINNEMANN (1977), DRABIKOWSKA (1977) und SIEDOW et al. (1978, 1979) eine Hemmung der Cyanid-insensitiven Atmung durch DBMIB in Mitochondrien von Neurospora und von Phaseolus aureus beschrieben. In teilweise gereinigten Präparaten der alternativen Oxidase aus Arum maculatum wurde keine DBMIB-Hemmung beobachtet (RICH 1978).

E.3.1.1. Einfluß des DBMIB auf den Cyanid-sensitiven Atmungsweg

E.3.1.1.1. Bei Mitochondrien des Wildstamms der Neurospora crassa

Niedrige Konzentrationen von DBMIB ($\leq 5\ \mu M$) verursachten keine Änderung oder eine leichte Stimulierung der Sauerstoffverbrauchsraten bei Mitochondrien des Neurospora Wildstamms. Höhere DBMIB-Konzentrationen hemmten die Respiration; die für die halb-maximale

Hemmung notwendige DBMIB-Konzentration (I_{50}) war abhängig von den Atmungssubstraten. So war die Hemmung mit Citrat (+Malat) als Substrat größer als mit Succinat, und mit exogenem NADH als Substrat konnte unter den normalen Versuchsbedingungen keine nennenswerte DBMIB-Hemmung beobachtet werden. In allen Fällen lagen die I_{50}-Werte für die State 3-Atmung niedriger als für die State 4-Atmung.

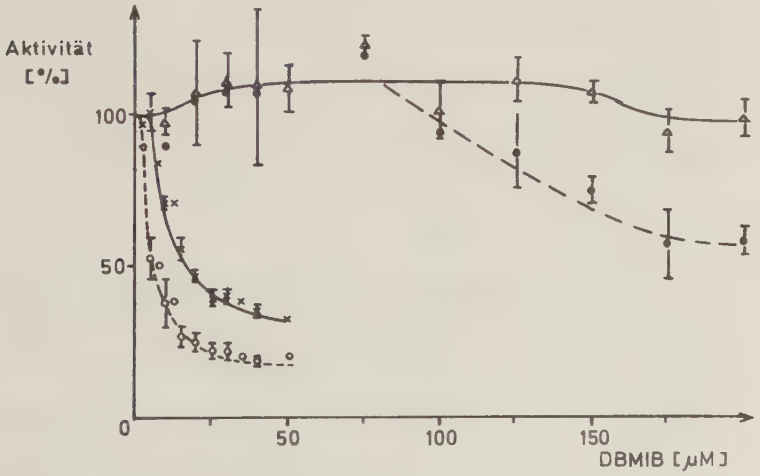


Abb.12 Atmungsaktivität der Neurospora Wildstamm-Mitochondrien in Abhängigkeit von der DBMIB-Konzentration
Der ungehemmte Sauerstoffverbrauch (100%) entspricht den in Tabelle 2 (S. 44) angegebenen Werten. Die verwendeten Substrate waren: Succinat 20 mM —×—, Succinat 20 mM und ADP 0,5 mM - - - -o- - -, exogenes NADH 2 mM —△—, bzw. exogenes NADH 2 mM und ADP 0,5 mM - - -●- - -.

Abbildung 12. zeigt die Aktivität der Mitochondrien des Neurospora Wildstamms mit Succinat bzw. mit exogenem NADH als Substrat in Abhängigkeit von der DBMIB-Konzentration. Der deutliche Unterschied zwischen der DBMIB-Hemmung der State 3-Atmung mit Succinat oder mit NADH als Substrat spricht gegen eine DBMIB-Hemmung der ATPase (SUN und CRANE 1976, HOUGHTON et al. 1976) bzw. gegen einen Wirkungsmechanismus, der ausschließlich auf einer DBMIB-verursachten unspezifischen Membranveränderung beruht (SIEDOW et al. 1978, 1979) - solange die Konzentration von DBMIB 50 bis 75 µM nicht übersteigt. Die DBMIB-Hemmung in Anwesenheit eines Entkopplers (Valinomycin plus Nigericin) zeigte ähnliche Charakteristika wie in Anwesenheit von Substrat plus ADP d.h. wie bei State 3 Atmung (nicht abgebildet).

Eine vollständige Hemmung des Sauerstoffverbrauchs wurde nicht erreicht, die Restaktivität nach maximaler Hemmung (bei 80-100 µM DBMIB) betrug z.B. mit Succinat als Substrat 20-30%. Wie die folgenden Ergebnisse (siehe u.a. E.3.1.1.2. und E.3.2.3.) noch deutlicher zeigen, ist es nicht sinnvoll, die DBMIB-Konzentration über 100-200 µM zu erhöhen, weil die unspezifischen Effekte des DBMIB bei hohen Konzentrationen immer mehr überwiegen.

E.3.1.1.2. Einfluß des DBMIB auf den Cyanid-sensitiven Atmungsweg bei Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum

Spadix-Mitochondrien von Arum spp. haben sehr niedrige Cyanid-sensitive Atmungsaktivität. Um den DBMIB-Einfluß auf die normale Atmung via Cytochrome bei einer Aracea-Pflanze zu untersuchen, wurden Mitochondrien aus Rhizomen von Arum cornutum verwendet. Die Eigenschaften der Mitochondrien sind in Tabelle 4 (S. 51) dargestellt.

Es war nicht möglich, I_{50}-Werte für die DBMIB-Hemmung der Cyanid-sensitiven mitochondrialen Atmung aus Arum-Rhizomen zu bestimmen. Bei relativ hohen Mitochondrienkonzentrationen (1-2 mg/ml) waren erst DBMIB-Konzentrationen von $\geqslant$ 170µM für eine 50%-ige Hemmung ausreichend gewesen. Abbildungen 13-15 zeigen die relative Aktivität der Mitochondrien in Anwesenheit von 170 µM DBMIB in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentation. Bei allen drei Substraten ist die Tendenz erkennbar, daß bei konstanter Inhhibitorkonzentration die Hemmung mit größeren Mitochondrienkonzentrationen abnimmt. Der Sauerstoffverbrauch mit den verschiedenen Substraten war durch DBMIB in der Reihenfolge Succinat > Citrat > NADH hemmbar.

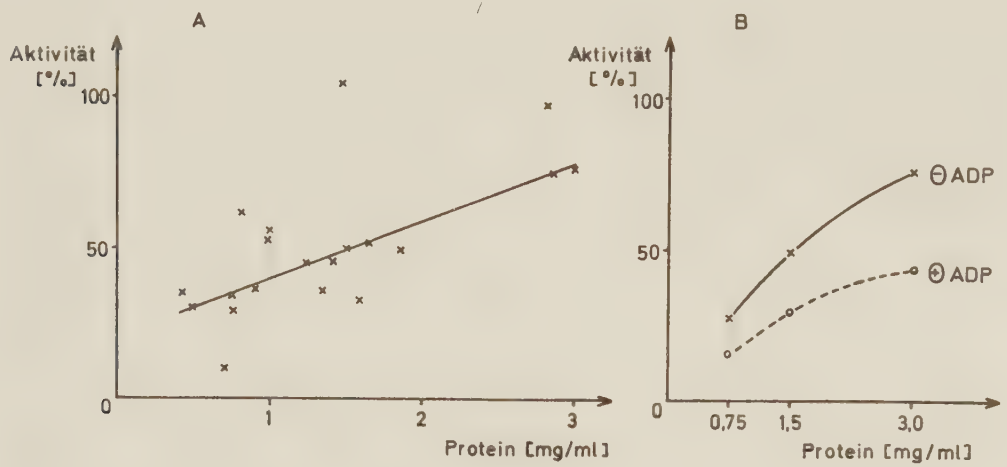


Abb.13 DBMIB-Hemmung der Atmung mit Succinat (20mM) als Substrat bei Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration.

Bei A sind die Ergebnisse von 10 Mitochondrienisolierungen zusammengefasst, B zeigt ein typisches Experiment. Die Konzentration von DBMIB betrug 170 µM, die von ADP 1 mM. Die Aktivitäten sind als Prozentsatz der jeweiligen ungehemmten Sauerstoffverbrauchsraten ausgedrückt.

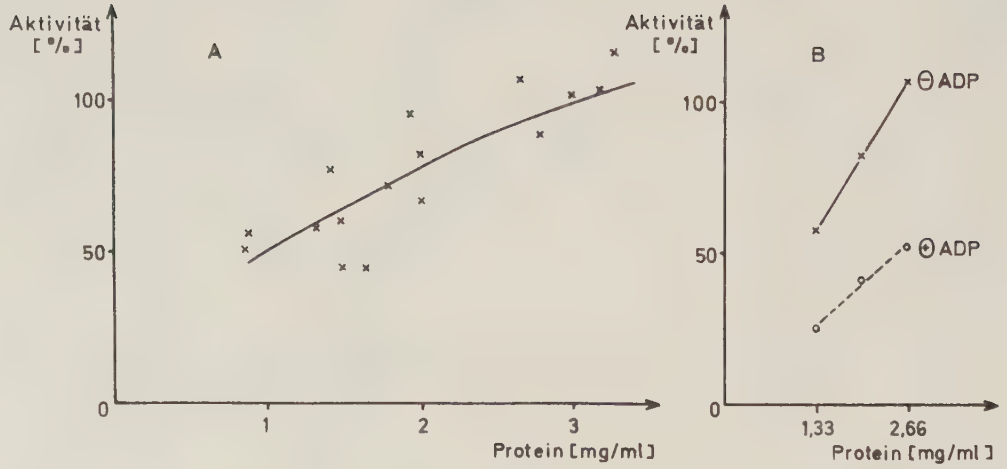


Abb.14 DBMIB-Hemmung der Atmung mit Citrat (20mM) als Substrat bei Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration.

Bei A sind die Ergebnisse von 11 Mitochondrienisolierungen zusammengefasst, B zeigt ein typisches Experiment. Die Konzentration von DBMIB betrug 170 µM, die von ADP 1 mM. Die Aktivitäten sind als Prozentsatz der jeweiligen ungehemmten Sauerstoffverbrauchsraten ausgedrückt.

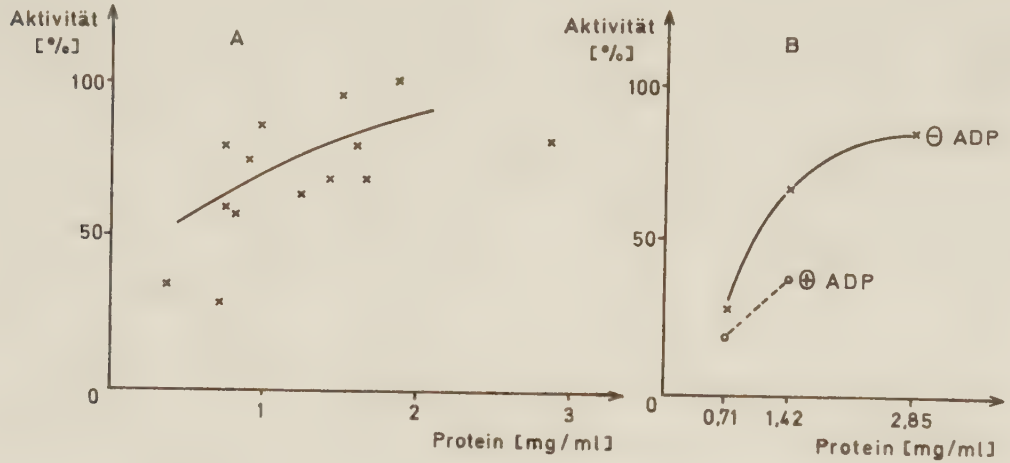


Abb.15 DBMIB-Hemmung der Atmung mit NADH (2mM) als Substrat bei Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration.

Bei A sind die Ergebnisse von 11 Mitochondrienisolierungen zusammengefasst, B zeigt ein typisches Experiment. Die Konzentration von DBMIB betrug 170 μM, die von ADP 1 mM. Die Aktivitäten sind als Prozentsatz der jeweiligen ungehemmten Sauerstoffverbrauchsraten ausgedrückt.

E.3.1.2. DBMIB-Hemmung der Cyanid-unempfindlichen Atmung

E.3.1.2.1. bei Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora crassa

DBMIB hemmte die Cyanid-unempfindliche Atmung sowohl mit Succinat und Citrat als auch mit exogenem NADH

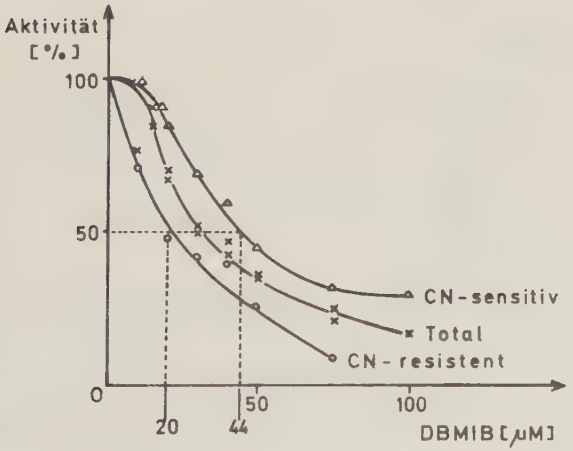


Abb.16 DBMIB-Hemmung der Atmung mit Succinat als Substrat in Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante.
Die Succinat-Konzentration betrug 20 mM, die Mitochondrienkonzentration 0,8 mg Protein/ml. Die Cyanid-sensitiven Atmungsraten wurden in Anwesenheit von 1,5 mM SHAM, die Cyanid-insensitiven Atmungsraten in Anwesenheit von 1,5 mM KCN gemessen.

als Substrat. Abbildungen 16 und 17 zeigen den DBMIB-Einfluß auf die ungehemmte Respiration und auf den Cyanid-sensitiven und Cyanid-insensitiven Atmungsweg bei Mitochondrien der poky-Mutante.

Die Cyanid-resistente Atmung reagierte empfindlicher auf DBMIB als die Cyanid-sensitive Atmung und konnte zu einem höheren Prozentsatz gehemmt werden. Dieser Befund wird durch die Ergebnisse von DRABIKOWSKA 1977 und SIEDOW et al. 1978, 1979 bestätigt. Die stärkere DBMIB-Hemmung der Cyanid-resistenten Atmung kam mit Succinat

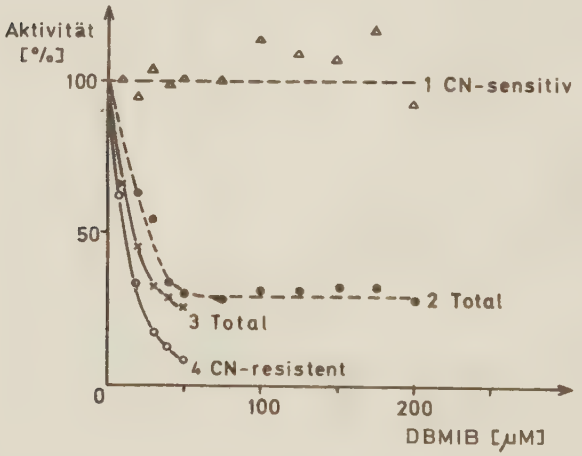


Abb.17 DBMIB-Hemmung der Atmung mit exogenem NADH als Substrat in Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante.
Die NADH-Konzentration betrug 2 mM, die Mitochondrienkonzentration bei Kurve 1 und 2 betrug 0,76 mg Protein/ml, bei Kurve 3 und 4 0,38 mg Protein/ml. Die Cyanid-sensitiven Atmungsraten wurden in Anwesenheit von 1,5 mM SHAM, die Cyanid-insensitiven Atmungsraten in Anwesenheit von 1,5 mM KCN gemessen.

als Substrat durch einen niedrigeren I_{50}-Wert zum Ausdruck (Abbildung 16). Mit exogenem NADH als Substrat wurde die Atmung via Cytochrome durch DBMIB-Konzentrationen bis zu 100-200 µM nicht gehemmt, der Cyanid-resistente Sauerstoffverbrauch dagegen schon durch 50 µM DBMIB zu 90% inhibiert (s. Abbildung 17). Ein Unterschied in der DBMIB-Hemmung der beiden Atmungswege bestand mit Citrat(+Malat) als Substrat ebenfalls, war aber viel schwächer ausgeprägt als mit Succinat oder NADH als Substrat.

E.3.1.2.2. DBMIB-Hemmung der Cyanid-unempfindlichen Atmung bei Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum

Ähnlich wie bei Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante, hemmte DBMIB die Cyanid-unempfindliche Atmung der Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum. Ein typisches Experiment mit Succinat, exogenem NADH bzw. Citrat als Substrat ist in Abbildung 18 gezeigt. Bei niedrigen DBMIB-Konzentrationen konnte eine kurze lag-Phase ähnlich wie in Abbildung 16 beobachtet werden.

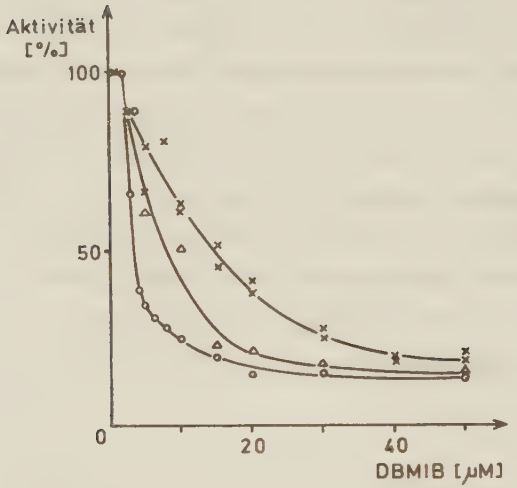


Abb.18 DBMIB-Hemmung der Cyanid-unempfindlichen Atmung der Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum. Der Sauerstoffverbrauch wurde in Anwesenheit von 2 mM KCN gemessen. Die Substratkonzentrationen waren: Succinat 20 mM (— × —) ,exogenes NADH 2 mM (— o —),und Citrat 20 mM (— △ —). Die Mitochondrienkonzentration betrug 0,37 mg Protein/ml bei Messungen mit Succinat oder NADH als Substrat, und 0,74 mg Protein/ml bei Messungen mit Citrat als Substrat.

E.3.1.3. Zusammenfassung des DBMIB-Einflußes auf die Cyanid-emfindliche und Cyanid-unempfindliche Atmung

Eine Zusammenfassung der I_{50}-Werte der DBMIB-Hemmung des Sauerstoffverbrauchs mit verschiedenen Substraten ist für Mitochondrien des Wild- und poky-Stammes von Neurospora in Tabelle 8, für die Cyanid-resistente

	Neurospora wild			Neurospora poky		
	I_{50} [µM]	$\left[\frac{\text{mg Prot.}}{\text{ml}}\right]$	n	I_{50} [µM]	$\left[\frac{\text{mg Prot.}}{\text{ml}}\right]$	n
Succinat 20mM						
Zustand 3	8,0±2,4	0,57±0,09	4			
Zustand 4	17,3±1,9	0,57±0,09	4	15,9±2,2	0,64±0,10	8
CN-resistent				13,3±3,4	0,67±0,14	6
CN-sensitiv				27,0±5,7	0,64±0,06	6
NADH 2mM						
Zustand 3	>50	0,69±0,10	5			
Zustand 4	>100	0,69±0,10	5	-	-	-
CN-resistent				19,5±4,3	0,63±0,05	8
CN-sensitiv				>100	0,68±0,03	5
Citrat 20mM						
Zustand 3	13,0	1,01	1			
Zustand 4	16,9±3,0	1,12±0,22	4	16,0±6,0	1,07±0,17	2
CN-resistent				13,8±4,0	1,07±0,17	2
CN-sensitiv				19,0±7,0	1,07±0,17	2

Tabelle 8: I_{50}-Werte der DBMIB-Hemmung der Mitochondrien des Neurospora crassa Wild- und poky-Stammes.

Der Sauerstoffverbrauch im Zustand 3 der Atmung wurde in Anwesenheit von 1mM ADP gemessen, die Cyanid-resistente Atmung in Anwesenheit von 1,5mM KCN, die Cyanid-sensitive Atmung in Anwesenheit von 1,5mM SHAM, n gibt die Zahl der Experimente an.

		/ Neurospora poky	Arum maculatum
Succinat	I_{50} [µM]	13,3 ± 3,4	23,4 ± 2,8
	Protein [mg/ml]	0,67 ± 0,14	0,76 ± 0,13
	$I_{50,Protein}$ [µM/mg]	19,2 ± 3,2	32,3 ± 2,0
	n	6	7
NADH	I_{50} [µM]	19,5 ± 4,3	5,0 ± 0,8
	Protein [mg/ml]	0,63 ± 0,05	0,50 ± 0,09
	$I_{50,Protein}$ [µM/mg]	31,3 ± 4,7	10,1 ± 1,0
	n	8	8
Citrat	I_{50} [µM]	13,8 ± 4,0	7,5 ± 1,0
	Protein [mg/ml]	1,07 ± 0,17	0,65 ± 0,09
	$I_{50,Protein}$ [µM/mg]	12,5 ± 2,5	11,6 ± 0,8
	n	2	5

Tabelle 9: I_{50}-Werte der DBMIB-Hemmung der Cyanid-unempfindlichen Atmung in Neurospora- und Arum maculatum Mitochondrien.

Die Substratkonzentrationen sind mit denen in Tab.6 identisch. Der Sauerstoffverbrauch wurde in Anwesenheit von 1,5mM KCN gemessen. "$I_{50,Protein}$" ist der arithmetische Mittelwert der auf 1 mg Protein bezogenen I_{50}-Werte, n ist die Anzahl der Experimente.

Atmung in Tabelle 9 dargestellt. Die I_{50}-Werte sind arithmetische Mittelwerte von n (die Anzahl ist in der Tabelle angegeben) unabhängigen Experimenten. In Tabelle 9 ist auch ein sogenannter "$I_{50,\ Protein}$"-Wert angegeben, der den arithmetischen Mittelwert der auf 1 mg mitochondriales Protein bezogenen I_{50}-Werte der einzelnen Experimenten darstellt.

Die Eigenschaften der DBMIB-Hemmung der mitochondrialen Atmung bei Arum und Neurospora können in folgenden Punkten zusammengefasst werden:

1. DBMIB hemmte die Cyanid-unempfindliche Atmung in Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante und des Arum Spadix mit $I_{50,\ Protein}$-Werten zwischen 10 und 30 µM mit Succinat, Citrat(+Malat) oder exogenem NADH als Substrat.

2. DBMIB hemmte die normale, Cyanid-sensitive Atmung in Mitochondrien des Wild- und poky-Stammes von Neurospora mit Succinat oder Citrat(+Malat) als Substrat ($I_{50,\ Protein}$ =30 bzw. 15 µM), übte aber keine spezifische Wirkung auf die Phosphorylierung aus.

3. Die charakteristischen Hemmungskurven fingen bei niedrigen DBMIB-Konzentrationen mit einer lag-Phase an, in der DBMIB die Atmung nicht veränderte (oder stimulierte). Höhere DBMIB-Konzentrationen hemmten den Sauerstoffverbrauch, konnten ihn aber nicht vollständig unterbinden.

4. Die Cyanid-sensitive Atmung mit exogenem NADH als

Substrat konnte in Mitochondrien des Neurospora Wild- und poky-Stammes durch DBMIB nicht gehemmt werden.

5. Aus Punkte 1. und 4. folgt, daß eine der DBMIB-Hemmstellen auf dem alternativen, Cyanid-insensitiven Atmungsweg liegen könnte.

6. DBMIB war als Atmungsinhibitor für die Cyanid-sensitiven Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum schlecht verwendbar. Da die relativen Atmungsraten bei konstanter DBMIB-Konzentration eine Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration zeigten, liegt die Vermutung nahe, daß die DBMIB-Resistenz eine Folge der relativ hohen Mitochondrienkonzentration sein könnte. Eine andere Möglichkeit wäre die Zersetzung des DBMIB durch die Mitochondrien selbst oder durch andere , verunreinigende Substanzen in der Mitochondrien-Suspension (REIMER und TREBST 1976).

Es gibt Literaturdaten, die zu meinen Befunden bzw. Interpretation in Widerspruch stehen:

a) DRABIKOWSKA (1977) beschrieb die DBMIB-Hemmung der Cyanid-sensitiven NADH-Oxidase beim Neurospora Wildstamm (vgl. Punkt 4).

b) RICH (1978) konnte die Cyanid-resistente Ubichinol-Oxidase aus Spadix-Mitochhondrien von Arum maculatum mit DBMIB nicht hemmen (vgl. Punkt 5).

c) SIEDOW et al. (1978, 1979) fanden, daß die DBMIB-Hemmung von der Mitochhondrienkonzentration unabhängig

sei (vgl.Punkt 6).

Es wurde der Versuch unternommen, die Widersprüche und den Wirkungsmechanismus des DBMIB zu klären.

E.3.2. Experimente zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus von DBMIB auf die mitochondriale Atmung

E.3.2.1. Abhängigkeit der Hemmung von der Mitochondrienkonzentration

Wenn die DBMIB-Hemmung von der Mitochondrienkonzentration abhhängig wäre, könnte man auf Grund der Hemmungskurven erwarten, daß diese Abhängigkeit am deutlichsten in der lag-Phase oder in der steil abfallenden Phase der Kurve, d.h. bei $[DBMIB]_{total} \leqslant I_{50}$ zum Ausdruck käme.

E.3.2.1.1. DBMIB Hemmung der Atmung mit $[DBMIB]_{total} \leq I_{50}$-

E.3.2.1.1.1. bei Arum-Mitochondrien

Auf die Abhängigkeit der relativen Atmungsaktivität der Rhizom-Mitochondrien aus Arum cornutum von der

TABELLE 10

Substrat		Aktivität %	Protein-konzentration [mg/ml]	r	n
Succinat	20mM	53,3	1,33	0,56	22
		s 29,7	0,75		
Succinat +ADP	20mM 1mM	24,7	1,36	0,80	16
		s 14,6	0,85		
NADH	2mM	78,4	1,20	0,18	17
		s 32,9	0,64		
NADH +ADP	2mM 1mM	37,1	1,03	0,46	13
		s 20,4	0,47		
Citrat	20mM	72,2	1,91	0,86	17
		s 29,3	0,81		
Citrat +ADP	20mM 1mM	40,8	1,76	0,70	11
		s 20,6	0,83		

Tabelle 10 Korrelation zwischen Atmungsaktivität und Mitochondrienkonzentration der Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum in Anwesenheit von 170 µM DBMIB.
Die Atmungsaktivität ist als Prozentsatz der ungehemmten Atmung ausgedrückt, die Mitochondrienkonzentration im mg Protein/ml. Die angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte, darunter steht die Standardabweichung (s). r ist die errechnete Korrelationskoefficient, n die Anzahl der Messungen.

Mitochondrienkonzentration bei konstanter DBMIB-Konzentration (Abbildungen 13-15) sei nochmals hingewiesen. Die Korrelationskoeffizienten (r) der relativen Aktivität und der Mitochondrienkonzentration sind in Tabelle 10 dargestellt. Bei allen Substraten konnte eine

positive Korrelation zwischen Atmungsaktivität in Anwesenheit von 170 µM DBMIB und Mitochondrienkonzentration beobachtet werden, die Korrelation mit Succinat oder Citrat als Substrat war mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant. Mit NADH als Substrat wären r-Werte von 0,48 für die State 4-Atmung und 0,57 für die State 3 Atmung notwendig, um diesen Irrtumswahrscheinlichkeitsbereich zu erreichen, gefunden wurden jedoch nur 0,18 bzw. 0,46. Der Unterschied zwischen dem gefundenen r-Wert und dem, der zu erwarten wäre, wenn die Hypothese stimmte, ist besonders groß bei der State 4-Atmung mit exogenem NADH als Substrat, was möglicherweise durch die zu niedrige DBMIB-Hemmung der NADH-Oxidase Aktivität erklärt werden könnte.

E.3.2.1.1.2. DBMIB-Hemmung der Atmung mit $[DBMIB]_{total} \leq I_{50}$- bei Neurospora crassa

Zunehmende Atmungsaktivität mit zunehmender Mitochondrienkonzentration bei konstanter DBMIB-Konzentration in Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora crassa zeigt Abbildung 19. Durch 8,5 µM DBMIB konnte die Cyanid-unempfindliche Atmung bei Mitochondrienkonzentrationen von 0,2 bzw. 0,8 mg Protein/ml um 60% bzw. 20% gehemmt werden. Die Cyanid-sensitive State 4-Atmung blieb bei dieser DBMIB-Konzentration unverändert; in Anwesenheit

von Entkoppler hemmte DBMIB bei 0,2 mg Protein/ml Mitochondrienkonzentration etwa 20% der Atmung, war aber bei höheren Proteinkonzentrationen unwirksam (nicht abgebildet). Eine zehnfach erhöhte DBMIB-Konzentration (85 µM) hemmte bei allen Mitochondrienkonzentrationen die entkoppelte Cyanid-sensitive Atmung (nicht abgebildet), die State 4-Atmung dagegen wurde bei Mitochondrienkonzentrationen von > 0,5 mg Protein /ml nicht gehemmt.

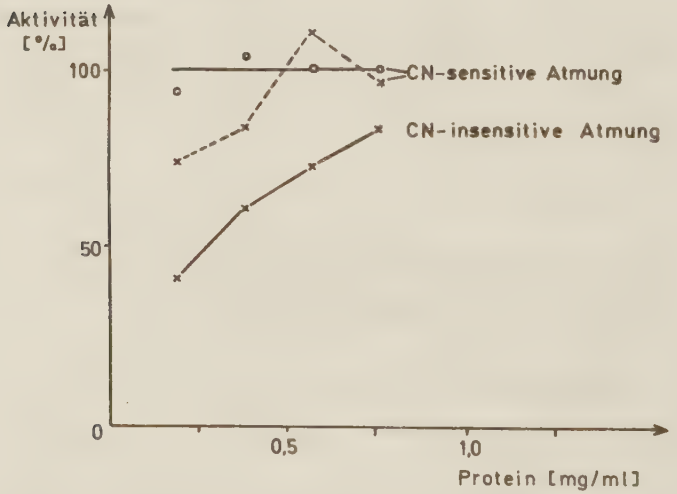


Abb. 19 Abhängigkeit der DBMIB-Hemmung der Atmung mit 2 mM NADH als Substrat von der Mitochondrienkonzentration bei der Neurospora poky-Mutante.
Die Cyanid-insensitive Atmung wurde in Anwesenheit von 1,5 mM KCN, die Cyanid-sensitive Atmung in Anwesenheit von 1,5 mM SHAM gemessen. Die DBMIB-Konzentration betrug 8,5 µM (durchgezogene Linien) bzw. 85 µM (gestrichelte Linie bei der Cyanid-sensitiven Atmung).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die positive Korrelation zwischen dém Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien in Anwesenheit von DBMIB und der Mitochondrienkonzentration nicht Substrat- oder Atmungsweg-abhängig ist, sondern vielmehr eine allgemeine Erscheinung bei der DBMIB-Hemmung der Atmung.

Es sei noch auf Abbildung 17 hingewiesen, welche ebenfalls eine größere DBMIB-Hemmung der Gesamtatmung bei niedrigerer Konzentration an poky-Mitochondrien demonstriert (Kurve 2 und 3).

E.3.2.1.2. I_{50}-Werte in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration

E.3.2.1.2.1. bei Mitochondrien von Neurospora crassa

Die I_{50}-Werte der DBMIB-Hemmung der verschiedenen respiratorischen Aktivitäten der Neurospora crassa Mitochondrien (poky- und Wild-Stamm) in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration sind in Abbildung 20 dargestellt. Eine einfache Abhängigkeit der zwei Variablen konnte bei keiner der Atmungsaktivitäten nachgewiesen werden, sie zeigten jedoch positive Korrelation mit Korrelationskoeffizienten von r=0.74-0,99 (Tabelle 11). Die Korrelation ist für die meisten Aktivitäten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% signifikant, außer bei den I_{50}-Werten

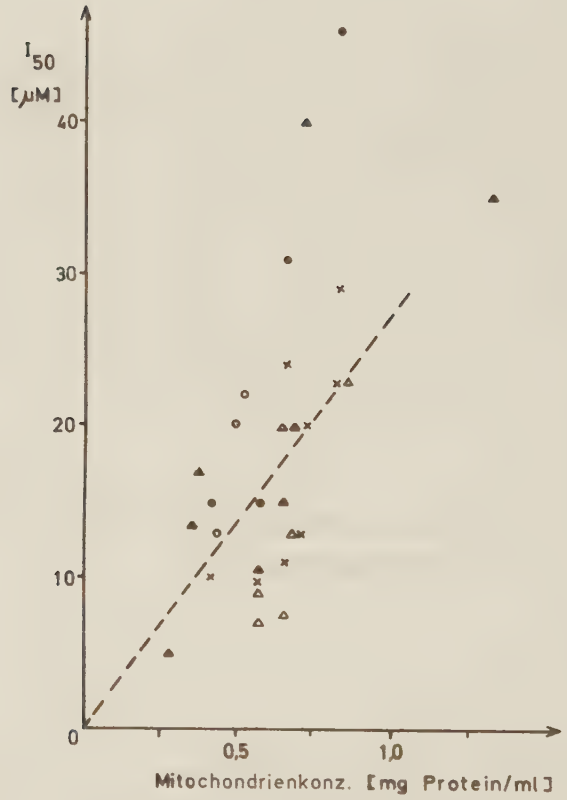


Abb. 20 I_{50}-Werte der DBMIB-Hemmung der Atmung der Neurospora-Mitochondrien des poky- und Wild-Stammes mit 20 mM Succinat bzw. 2 mM NADH als Substrat in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration.

Die Cyanid-sensitive Atmung wurde in Anwesenheit von 1,5 mM SHAM, die Cyanid-resistente Atmung in Anwesenheit von 1,5 mM KCN gemessen. In der Abbildung sind die Werte der Cyanid-resistenten Atmung mit exogenem NADH (▲), der totalen Atmung (in Abwesenheit von KCN und SHAM) mit Succinat (×), der Cyanid-sensitiven (●) und Cyanid-resistenten ( ) Atmung mit Succinat als Substrat bei poky-Mitochondrien, und die Werte der Cyanid-sensitiven Atmung der Wild-Mitochondrien mit Succinat (○) als Substrat gezeigt.

der DBMIB-Hemmung der Cyanid-sensitiven Atmung mit Succinat als Substrat, wo der Korrelationskoeffizient geringfügig unter dem Grenzwert liegt.

TABELLE 11

Stamm und Substrat		I_{50} [µM]	Protein-konzentration [mg/ml]	r	n
Neurospora Wild					
20mM Succinat		18,3	0,49	0,997	3
	s	4,7	0,05		
Neurospora poky					
20mM Succinat					
Ungehemmt		15,9	0,65	0,77	8
	s	7,5	0,12		
CN^--sensitiv		27,0	0,64	0,81	6
	s	14,0	0,14		
CN^--resistent		13,3	0,67	0,82	6
	s	6,8	0,10		
2mM NADH					
CN^--resistent		19,5	0,63	0,74	8
	s	12,0	0,33		

Tabelle 11 Korrelation zwischen I_{50}-Werten und Mitochondrienkonzentration bei der DBMIB-Hemmung der Neurospora-Mitochondrien.
Die I_{50}-Werte sind in µM, die Mitochondrienkonzentrationen in mg Protein/ml angegeben. Die angegebenen Werte sind arithmetische Mittelwerte, s zeigt die Standardabweichung, r ist der errechnte Korrelationskoeffizient, n die Anzahl der Messungen.

E.3.2.1.2.2. I_{50}-Werte in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration bei Cyanid-resistenten Arum-Mitochondrien

Die Abhängigkeit der I_{50}-Werte der DBMIB-Hemmung des Sauerstoffverbrauchs (mit Succinat, NADH oder Citrat als Substrat) von der DBMIB-Konzentration bei Spadix-Mitochondrien von Arum ist in Abbildung 21 dargestellt. Die Zunahme der für die halbmaximale Hemmung notwendigen DBMIB-Konzentration bei höheren Mitochondrienkonzentrationen war bei NADH und Citrat als Substrat sehr ähnlich. Bei Succinat verlief die Kurve steiler, es zeichnete sich eine größere Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration ab. Es ist nicht auszuschließen, daß zu den höheren I_{50}-Werten der DBMIB-Hemmung der Atmung mit Succinat als Substrat beigetragen hat, daß die Succinat-Dehydrogenase nur durch Inkubation mit dem Substrat, nicht jedoch durch ATP-Zugabe aktiviert wurde (siehe S.49).

Die Korrelationskoeffizienten der I_{50}-Werte und Mitochondrienkonzentrationen sind in Tabelle 12 angegeben. Die Korrelation war bei den Experimenten mit Succinat und exogenem NADH als Substrat mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant, mit Citrat als Substrat lag sie leicht unter dem Grenzwert.

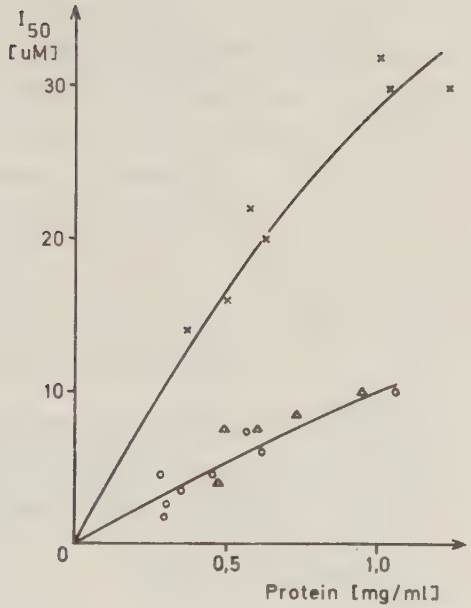


Abb. 21 I_{50}-Werte der DBMIB-Hemmung der Cyanid-unempfindlichen Atmung der Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration.
Der Sauerstoffverbrauch wurde in Anwesenheit von 2 mM KCN bestimmt. Als Substrat wurde 20 mM Succinat ( ), 20 mM Citrat ( ) oder 2 mM NADH (o) verwendet.

Aus den unter E.3.2.1. aufgeführten Ergebnissen geht hervor, daß eine Abhängigkeit der DBMIB-Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von der Mitochondrienkonzentration bei Neurospora- und Arum-Mitochondrien sehr wahrscheinlich ist (vgl. aber SIEDOW et al. 1978, 1979).

TABELLE 12

Substrat		I_{50} [µM]	Protein-konzentration [mg/ml]	r	n
Succinat	20mM	23,4	0,76	0,94	7
		s 7,3	0,33		
NADH	2mM	5,0	0,50	0,92	8
		s 2,7	0,26		
Citrat	20mM	7,5	0,65	0,83	5
		s 2,2	0,19		

Tabelle 12 Korrelation zwischen I_{50}-Werten und Mitochondrienkonzentrationen bei der DBMIB-Hemmung der Cyanid-unempfindlichen Atmung der Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum.
Der Sauerstoffverbrauch wurde in Anwesenheit von 2 mM KCN gemessen. Die I_{50}-Werte sind in µM, die Mitochondrienkonzentration in mg/ml angegeben. Die angegebene Werte sind arithmetische Mittelwerte, s zeigt die Standardabweichung, r ist der errechnete Korrelationskoeffizient und n die Anzahl der Messungen.

E.3.2.2. DBMIB-Bindung in Mitochondrien des Wild- und poky- Stammes von Neurospora crassa

Auf Grund der Abhängigkeit der DBMIB-Hemmung von der Mitochondrienkonzentration wurde die Hypothese aufgestellt, daß bei konstanter $DBMIB_{total}$-Konzentration die DBMIB-Konzentration in den Mitochondrien von der Mitochondrienkonzentration abhängig sei. Weil DBMIB ein kleines, stark lipophiles Molekül ist, könnte eine Phasen-Verteilung zwischen der wässrigen Phase (d.h.

Respirations-Medium) und der Lipidphase (d.h. Mitochondrienmembran) stattfinden. Bei Änderung der Konzentration der Lipidphase bei konstanter DBMIB-Konzentration (gesamt) und konstanter wässriger Phase würde sich die DBMIB-Konzentration in der Lipidphase, also in der Mitochondrienmembran verändern.

Ferner wurde die Frage gestellt, ob außer der Phasenverteilung auch eine zusätzliche spezifische(?) DBMIB-Bindung (vgl. M.7.2.) in den Mitochondrien nachzuweisen ist.

Bei den Mitochondrien des Wild- und poky-Stammes konnten keine deutlichen Unterschiede in der DBMIB-Bindung festgestellt werden, daher seien sie gemeinsam abgehandelt.

Es wurde gezeigt, daß die in Mitochondrien gebundene DBMIB-Menge sowohl von der Mitochondrienkonzentration als auch von der Gesamtkonzentration des DBMIB (weiter als $DBMIB_{total}$-Konzentration bezeichnet) abhängig ist. Abbildung 22 zeigt die Änderung der gebundenen DBMIB-Menge bei konstanter $DBMIB_{total}$-Konzentration in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration. Der entsprechende Versuch mit konstanter Mitochondrienkonzentration ergab auch eine Abhängigkeit der gebundenen DBMIB-Menge von der $DBMIB_{total}$-Konzentration (nicht abgebildet), die Abhängigkeit war jedoch bei niedrigen $DBMIB_{total}$-Konzentrationen nicht linear, wie

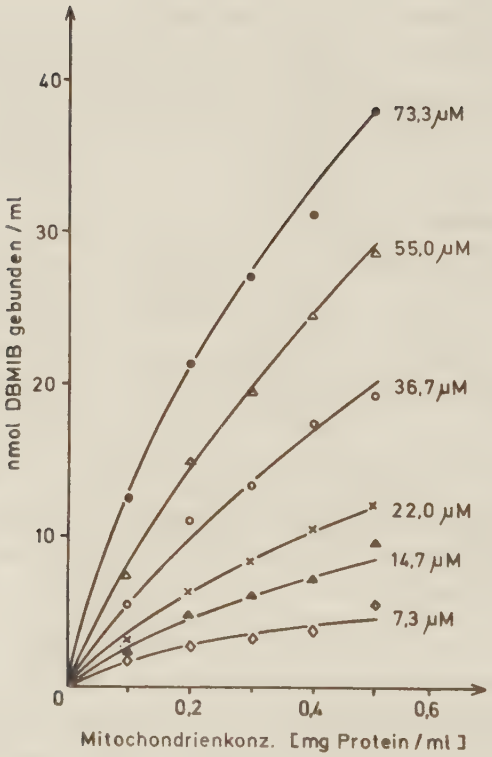


Abb. 22 DBMIB-Bindung in Abhängigkeit von der Mitochondrienkonzentration bei Neurospora Wildstamm. Die bei den einzelnen Kurven angegebenen Werte zeigen die $DBMIB_{total}$-Konzentration.

es im Falle einer reinen Phasenverteilung zu erwarten wäre.

Abbildung 23 zeigt den gebundenen Anteil des DBMIB bei verschiedenen Mitochondrienkonzentrationen als Funk-

tion der $DBMIB_{total}$-Konzentration. Der gebundene Anteil des DBMIB nahm zunächst mit zunehmenden $DBMIB_{total}$-Konzentration ab. Bei höherem $[DBMIB]_{total}$ zu Mitochondrien-Verhältnis wurden die Kurven annähernd parallel zur x-Achse. Die $DBMIB_{total}$-Konzentration, bei der die

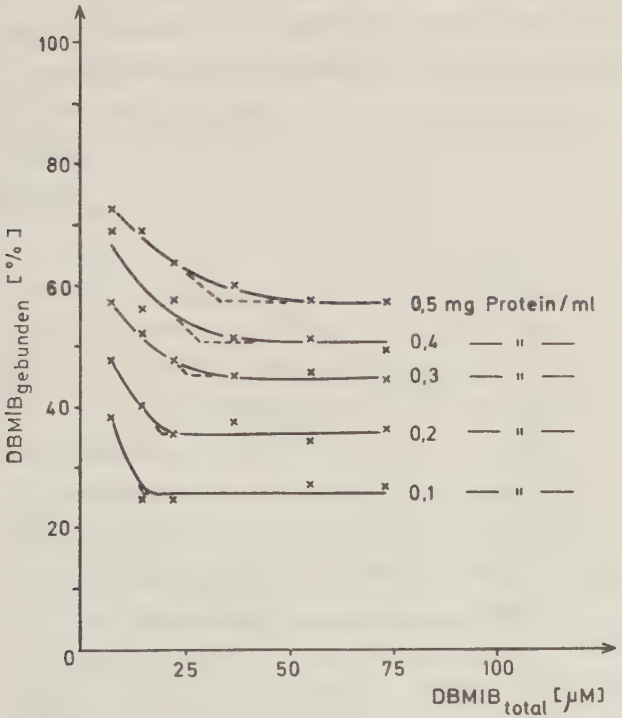


Abb. 23 Änderung des gebundenen Anteils des DBMIB bei verschiedenen Mitochondrienkonzentrationen in Abhängigkeit von der gesamten DBMIB-Konzentration in Neurospora Wildstamm.
Die Prozentzahlen beziehen sich auf das total zugegebene DBMIB.

Kurven fast parallel zur Abszisse verliefen, lag bei höheren Mitochondrienkonzentration höher. Einen Satz von Linien parallel zur x-Achse sollte man bei dieser graphischen Darstellung dann erwarten, wenn der Inhibitor mit den Mitochondrien infolge einer Phasenverteilung assoziiert wäre, wobei die Entfernung der Parallelen von der Abszisse durch die Konzentration der Lipidphase, d.h. durch die Mitochondrienkonzentration bestimmt würde.

Wenn bei der höheren $DBMIB_{total}$-Konzentrationen

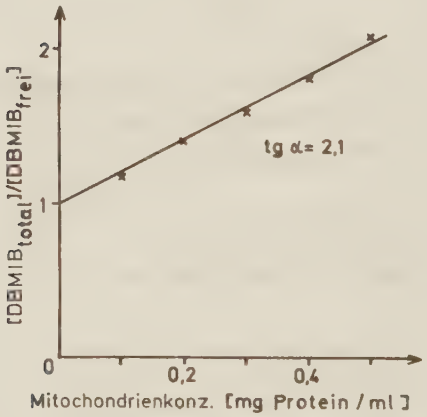


Abb. 24 DBMIB-Bindung als Phasenverteilung bei höheren $DBMIB_{total}$-Konzentrationen in Neurospora Mitochondrien.
Die $[DBMIB_{total}]/[DBMIB_{frei}]$-Werte wurden bei denjenigen $DBMIB_{total}$-Konzentrationen berechnet, wo für die jeweilige Mitochondrienkonzentration ein charakteristischer konstanter Prozentsatz an gebundenem DBMIB erreicht war (vgl. die Parallele zur Abszisse in Abbildung 23).

für die jeweiligen Mitochondrienkonzentrationen ein charakteristischer konstanter Prozentsatz an gebundenem DBMIB erreicht war, konnte die DBMIB-Bindung in Mitochondrien als einfache Phasenverteilung beschrieben werden. Der lineare Zusammenhang zwischen dem $DBMIB_{total}$ / $DBMIB_{frei}$ Quotienten und der Mitochondrienkonzentration ist in Abbildung 24 dargestellt. Die Gerade kann bei dem abgebildeten typischen Experiment mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{[DBMIB]_{total}}{[DBMIB]_{frei}} = 2{,}1 \times [\text{mg mitochonriales Protein /ml}] + 1,$$

wobei 2,1 der "mitochondriale Verteilungskoeffizient" in $[\text{nmol DBMIB}_{gebunden}/\text{mg Protein}] / [\mu\text{M DBMIB}_{frei}]$ ist.

Wie es aufgrund der Phasenverteilung erwartet werden konnte, war die DBMIB-Konzentration <u>in</u> den Mitochondrien von der $DBMIB_{total}$-Konzentration und von der Mitochondrienkonzentration abhängig (Abbildung 25). Die Abhängigkeit von der $DBMIB_{total}$-Konzentration war jedoch im unteren Konzentrationsbereich nicht linear, wie es bei einer einfachen Phasenverteilung der Fall wäre, sondern die Werte lagen mit etwa 5 nmol $DBMIB_{gebunden}$/mg Protein über den einem linearen Zusammenhang entsprechenden Werten.

Die gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, daß DBMIB mit den Mitochondrien sowohl durch eine Phasenverteilung als auch durch zusätzliche Bindung assoziiert werden kann. Die experimentell bestimmte Konzentration

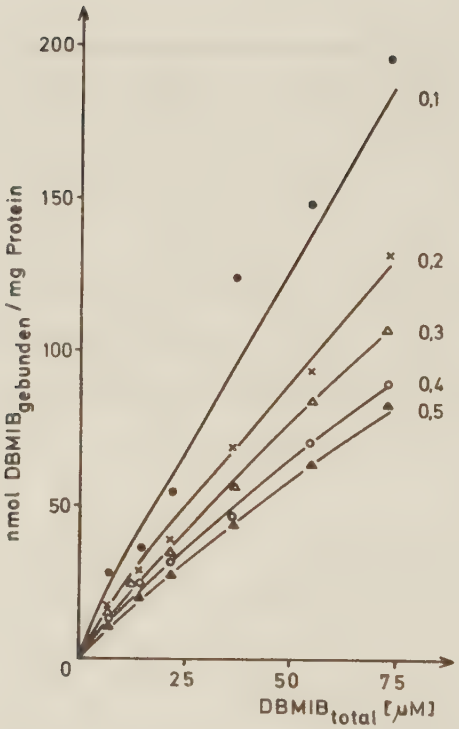


Abb. 25 DBMIB-Konzentration in den Mitochondrien des Neurospora Wildstammes in Abhängigkeit von der $DBMIB_{total}$-Konzentration.
Die bei den einzelnen Kurven angegebenen Werte zeigen die Mitochondrienkonzentration in [mg Protein/ml].

des in Mitochondrien befindlichen DBMIB, R_{total}, wäre

bei niedrigen $DBMIB_{total}$-Konzentrationen

$$R_{total} = R_{\alpha} + R_{b}$$

bei hohen $DBMIB_{total}$-Konzentrationen

$$R_{total} \approx R_{\alpha}$$

(wobei alle R-Werte in nmol $DBMIB_{gebunden}$/mg mitochondriales Protein ausgedrückt sind, R_α die Konzentration des aufgrund der Phasenverteilung gebundenen und R_b die Konzentration des durch die zusätzlichen spezifischen(?) Bindungsstellen gebundenen DBMIB bezeichnet). R_α könnte bei hohen $DBMIB_{total}$-Konzentrationen aus R_{total} oder aus der Steigung der Kurve: R_{total} gegen die Konzentration des ungebundenen DBMIB (Abbildung 26) geschätzt werden unter der Annahme, daß $R_\alpha >> R_b$ zutrifft. In beiden Fällen würde es sich um eine maximale Schätzung von R_α handeln.

Experimentell konnte ein "mitochondrialer Verteilungskoeffizient"

$$\frac{R_{total}}{c} \approx \frac{R_\alpha}{c} = 2{,}1 \pm 0{,}3$$

ermittelt werden, wobei c die Konzentration des freien DBMIB in μM ist. Die Formel beschreibt bei $c > 10\mu M$ zutreffend die Bindung und erlaubt die Voraussage von R_{total}, wenn die $DBMIB_{total}$-Konzentration bekannt ist.

Eine genaue Schätzung der R_b-Werte war nicht möglich, teils, weil sich die Fehler bei der Schätzung von R_b summieren, teils, weil in der Mehrheit der Fälle wahrscheinlich $R_\alpha >> R_b$ zutrifft. Aus den genannten Gründen konnte auch kein Scatchard-Plot (SCATCHARD 1949) für die Bestimmung von R_b verwendet werden.

Wenn der R_b-Wert als Schnittpunkt der Kurve R_{total}-gegen-c mit der y-Achse geschätzt wird, dürfte er bei

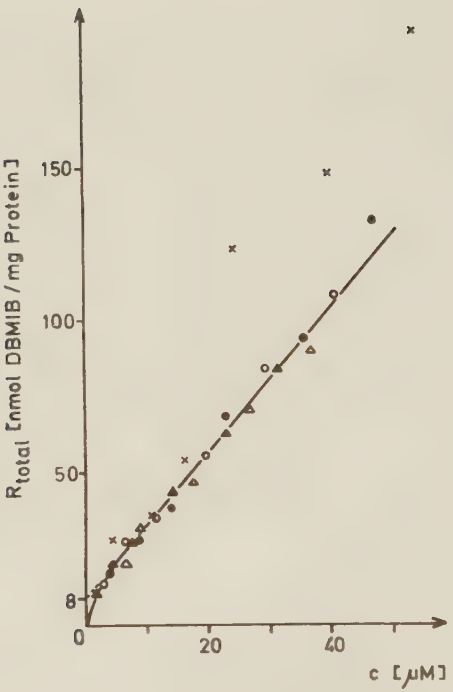


Abb. 26 DBMIB-Konzentration in Mitochondrien (R_{total}) des Neurospora Wildstammes in Abhängigkeit von der Konzentration des freien DBMIB (c).
Für den Bindungstest wurden Mitochondrien in einer Konzentration von 0,1 (✖), 0,2 (●), 0,3 ( ), 0,4 ( ) und 0,5 (▲) mg Protein/ml verwendet

etwa 8 nmol DBMIB/mg Protein liegen (Abbildung 26). Diese Art Annahme ist nur dann berechtigt, wenn die Sättigung schnell erreicht wird, d.h. die Affinität des DBMIB zu der (den) Bindungsstelle(n) hoch ist. Ob dies bei Neurospora-Mitochondrien zutrifft, kann ohne die Kenntnis der Dissoziationskonstanten nicht entschieden werden. Der

Übergang von $R_{total} = R_{\alpha} + R_b$ zu $R_{total} \approx R_{\alpha}$, d.h. die Sättigung der zusätzlichen Bindungsstellen erfolgte bei R_{total}-Werten von etwa 35 nmol DBMIB/mg Protein (vgl. Abbildung 23).

Es konnte nicht geklärt werden,welche Faktoren für die zusäztliche DBMIB-Bindung verantwortlich waren. Eine mögliche Fehlerquelle wäre, daß das chemisch relativ unbeständige DBMIB (REIMER et al. 1979) durch die Mitochondrien teilweise zersetzt würde. Weil die DBMIB-Bindung bei 1- und 30-minutiger Inkubation keinen Unterschied zeigte, halte ich eine messbare DBMIB-Zersetzung allerdings für unwahrscheinlich.

Was die Gültigkeit der Bindungsexperimente für die DBMIB-Hemmung der Atmung betrifft, soll betont werden, daß die Inkubation mit der für die Atmungsmessung identisch war; zentrifugiert wurde jedoch aus technischen Gründen bei $4^{o}C$, was eine Verschiebung des R/c-Wertes verursachen könnte.

E.3.2.3. DBMIB-Reduktion und Autoxidation in Mitochondrien

Es gibt viele Widersprüche in der DBMIB-Literatur darüber, ob und unter welchen Bedingungen DBMIB durch die Atmungskette reduziert werden kann. Manche Autoren

fanden sehr gute Atmungshemmung mit DBMIB und keinen Sauerstoffverbrauch nach Cyanid-Zugabe. Sie schlossen aus der fehlenden Autoxidation, daß DBMIB in Mitochondrien nicht reduziert wird (LOSCHEN und AZZI 1974, DRABIKOWSKA 1977, SIEDOW et al. 1978, 1979). Anderseits wurde in submitochondrialen bzw. Membranpartikeln mit blockierter Endoxidase nach DBMIB-Zugabe erheblicher Sauerstoffverbrauch infolge von DBMIB-Autoxidation beobachtet (MELANDRI et al. 1974, POOLE und HADDOCK 1975, SURKOV und KONSTANTINOV 1980).

Es wurde untersucht, ob DBMIB in intakten Neurospora-Mitochondrien reduziert wird, d.h. auch als Elektronen-Akzeptor fungieren kann, bzw. ob reduziertes DBMIB in der Mitochondrienmembran autoxidiert und dadurch zum Sauerstoffverbrauch beiträgt.

E.3.2.3.1. Spektroskopische Untersuchungen

Durch direktes spektroskopisches Verfolgen des Redox-Zustandes des DBMIB wurde nachgewiesen, daß DBMIB in intakten Mitochondrien durch die Elektrontransportkette in hohem Ausmaß reduziert wird.

Abbildungen 27 und 28 zeigen die Änderung der DBMIB-Spektren in Mitochondrien des Neurospora poky- und Wildstammes nach Zugabe von Succinat bzw. Succinat plus

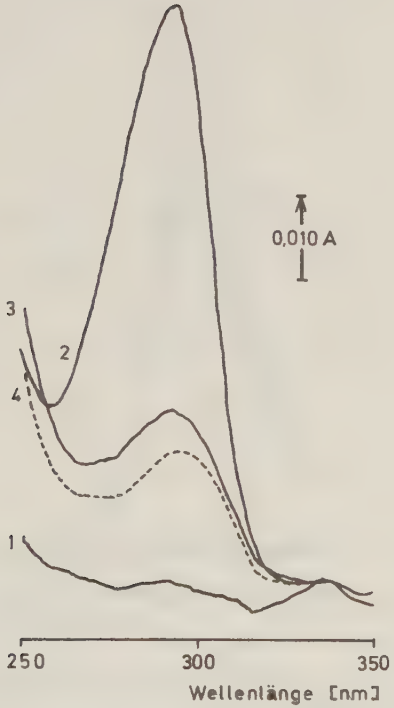


Abb. 27 DBMIB-Reduktion in Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante.
Kurve 1 ist die Grundlinie, Spektrum 2 wurde sofort nach Zugabe von 7,3 µM DBMIB aufgenommen. Nach Zugabe von 15 mM Succinat wurden die Mitochondrien 5 Minuten inkubiert und Spektrum 3 aufgenommen, dann mit 1,5 mM KCN versetzt, und nach 5 minütiger Inkubation Spektrum 4 (mit gestrichelter Linie) erhalten. Die Mitochondrienkonzentration betrug o,15 mg Protein/ml.

KCN. Die große Absoptionsabnahme bei 290 nm (Absorptionsmaximum des oxidierten DBMIB) und die Verschiebung des Maximums von 290 nm nach 297 nm (Absorptionsmaximum des

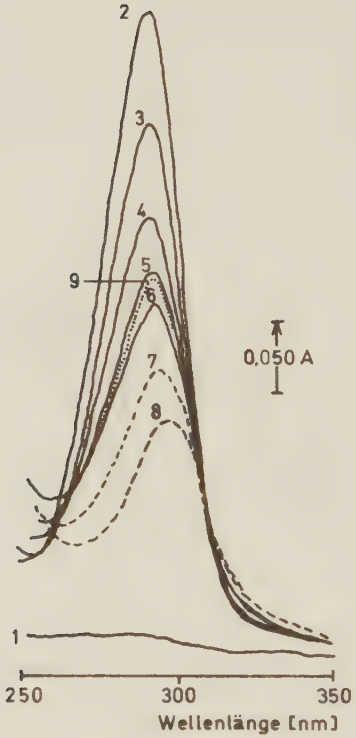


Abb. 28 DBMIB-Reduktion in Mitochondrien des Neurospora Wildstammes.

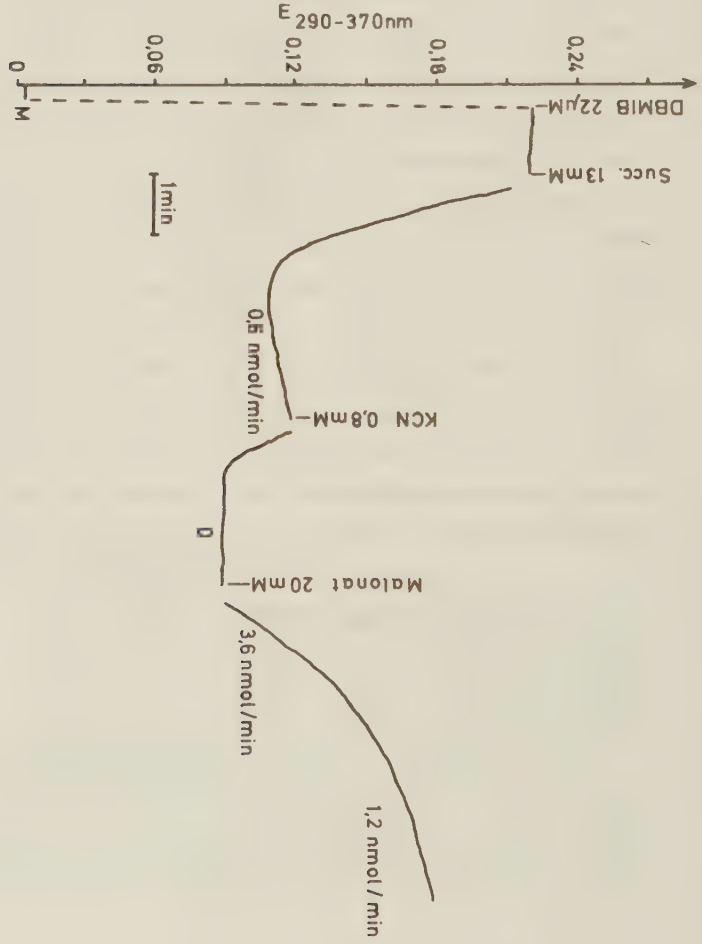
Die Mitochondrien (0,3mg Protein/ml) wurden in 33 µM DBMIB 5 Minuten vorinkubiert (Kurve 2), dann mit 15 mM Succinat versetzt und nach 1 min (Kurve 3), 3,5 min (Kurve 4), 6 min (Kurve 5) bzw. 10,5 Minuten (Kurve 6) wurden die Spektren aufgenommen. Nachdem eine maximale DBMIB-Reduktion in Anwesenheit von Succinat allein erreicht war, wurde 1,5 mM KCN zugegeben. Die Spektren mit gestrichelter Linie (7-8) zeigen die weitere DBMIB-Reduktion 1 bzw. 3,5 Minuten nach KCN-Zugabe. Die DBMIB-Autoxidation in Anwesenheit von 15 mM Malonat ist aus der Differenz zwischen Kurve 8 und 9 ersichtlich (Spektrum 9 wurde 10,5 Minuten nach Malonat-Zugabe aufgenommen). Kurve 1 ist die Grundlinie.

reduzierten DBMIB) sprechen eindeutig für eine DBMIB-Reduktion. In Anwesenheit von Succinat alleine erreichte die DBMIB-Reduktion ihr maximales Ausmaß nach 6-10 Minuten (Abb. 28), nach KCN-Zugabe wurde weitere DBMIB-Reduktion beobachtet. Die zusätzliche DBMIB-Reduktion nach KCN-Zugabe war unter den bei Abbildung 27 angegeben Bedingungen geringfügiger als bei denen in Abbildung 28.

Um die DBMIB-Autoxidation zu bestimmen, wurde die Succinat-Dehydrogenase mit Malonat gehemmt und die Zunahme des oxidierten DBMIB mit der Zeit verfolgt (Kurve 9 in Abbildung 28 und Abbildung 29). Die Kinetik der DBMIB-Reduktion und Autoxidation ist in Abbildung 29 gezeigt. Mit Succinat als Substrat wurden 10,8 nmol DBMIB, nach KCN-Zugabe insgesamt 13,5 nmol DBMIB reduziert, was Werten von 24 bzw. 30 nmol $DBMIB_{red}$/mg mitochondrialem Protein entspricht. In Anwesenheit von Succinat alleine konnte DBMIB-Autoxidation auch ohne Malonat-Zugabe beobachtet werden: auf das Erreichen der größten Absorptionsabnahme folgte eine langsame Absorptionszunahme. In Anwesenheit von Succinat und KCN konnte innerhalb von 2-3 Minuten trotz höherer Konzentration des reduzierten DBMIB spektroskopisch keine Autoxidation nachgewiesen werden.

Nach Hemmung der Succinat-Dehydrogenase mit Malonat konnte die Geschwindigkeit der DBMIB-Autoxidation in Anwesenheit von Succinat und KCN bestimmt werden. Die Geschwindigkeit der Autoxidation betrug 3,6 nmol $DBMIBH_2$

Abb. 29 Kinetik der DBMIB-Reduktion und Autoxidation in Mitochondrien des Neuropora Wildstammes.
In Anwesenheit von 13mM Succinat wurden 10,8 nmol DBMIB reduziert, nach KCN-Zugabe insgesamt 13,5 nmol. Die Geschwindigkeit der DBMIB-Autoxidation ist bei den entsprechenden Kurvenabschnitten in nmol $DBMIB_{ox}$/min angegeben. Die Mitochondrienkonzentration betrug 0,45 mg Protein/ml.



oxidiert/min sofort nach Malonat-Zugabe, und lag später niedriger. Wenn wir davon ausgehen, daß für die Oxidation von ein nmol $DBMIBH_2$ ein nmol O_2 verbraucht wird (d.h. daß das Oxidationsprodukt H_2O_2 ist), würde das einen Sauerstoffverbrauch von 3,6 nmol O_2/min/0,45 mg mitochondriales Protein bedeuten. Dies läge bei Messungen mit der Sauerstoffelektrode im Fehlerbereich der Methode. Durch die Autoxidation wäre jedoch erklärbar, daß der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien durch DBMIB nie vollständig unterbunden werden konnte.

Es ist unklar, inwieweit die DBMIB-Reduktion und Autoxidation das freie, in Mitochondrien nicht gebundene DBMIB einschließt. Chemisch reduziertes $DBMIBH_2$ autoxidierte in dem Respirationsmedium innerhalb von ein paar Minuten auch dann, wenn das Medium vor den spektroskopischen Messungen mit Stickstoff begast wurde. Unter den gleichen Bedingungen konnte in organischen Lösungsmitteln (Äthanol oder Äthanol-Heptan Gemisch) innerhalb von 40 Minuten keine $DBMIBH_2$-Autoxidation beobachtet werden. Wegen der hohen Autoxidabilität des $DBMIBH_2$ in dem wässrigen Respirationsmedium ist es sehr wahrscheinlich, daß, auch wenn es zum Austausch von Reduktionsäquivalenten zwischen dem in Mitochondrien gebundenem und dem freiem DBMIB käme, das freie DBMIB nur geringfügig zu der reduzierten DBMIB-Menge beitragen könnte.

Die DBMIB-Reduktion mit Succinat als Substrat

zeigte eine Abhängigkeit von der $DBMIB_{total}$-Konzentration, von der Mitochondrienkonzentration und von der Anwesenheit von Inhibitoren.

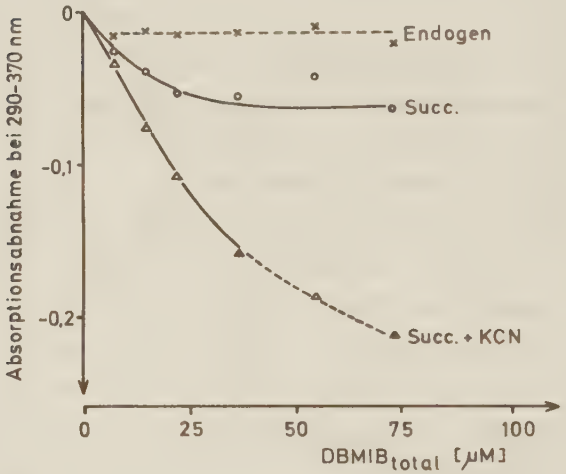


Abb. 30 Abhängigkeit der DBMIB-Reduktion von der $DBMIB_{total}$-Konzentration in Mitochondrien des Neurospora Wildstammes.
Die Mitochondrien (0,5 mg Protein/ml) wurden mit DBMIB bei Raumtemperatur 5 Minuten vorinkubiert, die gestrichelte Linie zeigt die Absorptionsabnahme während der Inkubation. Die Extinktionsabnahme in Anwesenheit von 10mM Succinat bzw. 10 mM Succinat und 1 mM KCN ist jeweils die gesamte Abnahme, und wurde bei der maximale Absorptionsabnahme bestimmt.

Bei konstanter Mitochondrienkonzentration nahm die Menge des reduzierten DBMIB mit wachsender $DBMIB_{total}$-Konzentration zu, und erreichte bei alleiniger Anwesenheit von Succinat ein Plateau (Abbildung 30). In KCN-

gehemmten Mitochondrien konnte kein Plateau, sondern vielmehr weitere DBMIB-Reduktion beobachtet werden. Die Werte bei den zwei höchsten $DBMIB_{total}$-Konzentrationen sind in Anwesenheit von Succinat und KCN mit einiger Unsicherheit behaftet, weil die DBMIB-Reduktion nur sehr langsam ihr Gleichgewicht erreichte (es gilt allgemein auch für die Reduktion in Anwesenheit von Succinat alleine, daß bei hohen $DBMIB_{total}$-Konzentrationen der Messfehler größer ist, weil die relativ niedrige reduzierte DBMIB-Menge im Gegenwart einer höheren Konzentration des oxidierten DBMIB bestimmt werden muß).

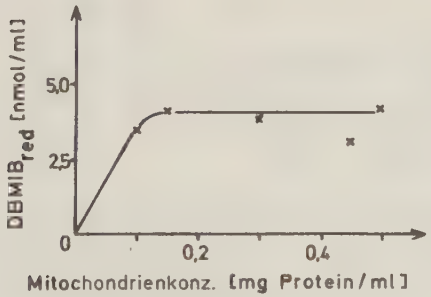


Abb. 31 Abhängigkeit der DBMIB-Reduktion von der Mitochondrienkonzentration bei einer $DBMIB_{total}$-Konzentration von 7,3 µM in Neurospora-Mitochondrien (Wildstamm und poky).
Die Werte sind Durchschnittswerte von verschiedenen Mitochondrienisolierungen und wurden mittels der jeweils experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten bestimmt (Mittelwert des $\varepsilon = 10{,}9\ mM^{-1}\ cm^{-1}$).

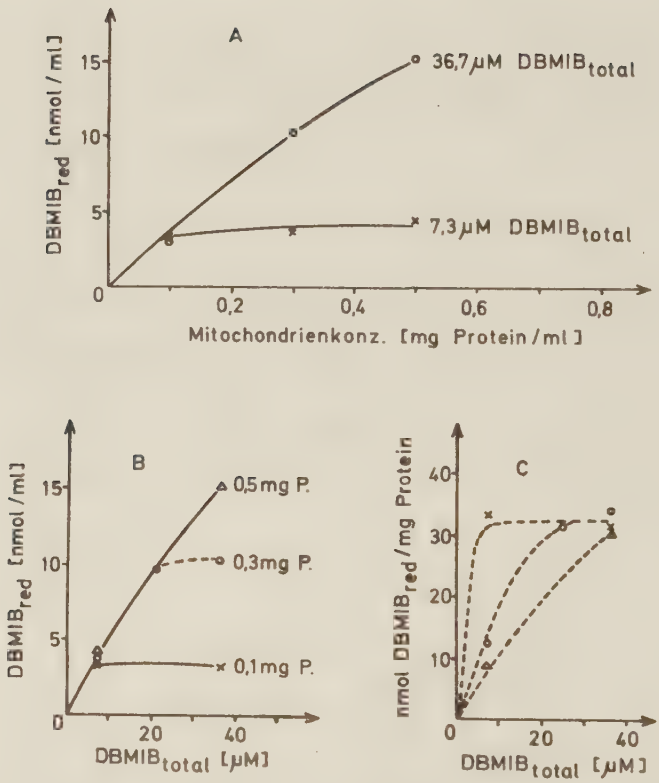


Abb. 32 Grenzwert der DBMIB-Reduktion mit Succinat als Substrat in Mitochondrien des Neurospora Wildstammes.

Die reduzierte DBMIB-Menge (nmol/ml)ist bei A gegen die Mitochondrienkonzentration, bei B gegen die $DBMIB_{total}$-Konzentration aufgetragen. C zeigt die Änderung der Konzentration des reduzierten DBMIB in den Mitochondrien in Abhängigkeit von der $DBMIB_{total}$-Konzentration bei Mitochondrienkonzentrationen von 0,1 (×), 0,3 (o) und 0,5 (△) mg Protein/ml (P). Dieselben Symbole wurden auch bei Kurve B verwendet. Die Succinatkonzentration betrug 13 mM. Die DBMIB-Reduktion wurde bei der maximalen Extinktionsabnahme mit folgenden Extiktionskoeffizienten

(Fortsetzung s. nächste Seite)

Bei einer vorgegebenen $DBMIB_{total}$-Konzentration von 7,3 µM war die reduzierte DBMIB-Menge, unabhängig von der Mitochondrienkonzentration, innerhalb der Fehlergrenze der Bestimmung konstant (Abbildung 31). Durch Erhöhung der $DBMIB_{total}$-Konzentration konnte bei höheren Mitochondrienkonzentrationen weitere DBMIB-Reduktion erreicht werden, die abhängig von der Mitochondrienkonzentration einem Grenzwert zuzustreben schien (Abbildung 32A und B). Bei dem abgebildeten Experiment wurden maximal etwa 32 nmol DBMIB/mg mitochondriales Protein reduziert (Abbildung 32C). Die experimentell bestimmten Extinktionskoeffizienten lagen bei dem in Abbildung 32 dargestellten Versuch deutlich niedriger als der Durchschnitt von anderen Experimenten, insbesondere bei der höchsten Mitochondrienkonzentration. Eine Unterschätzung des Extinktionskoeffizienten, und folglich die Überschätzung der reduzierten DBMIB-Menge könnte jedoch die Kurven nur insofern verschieben, als der Grenzwert der DBMIB-Reduktion bei der Mitochondrienkonzentration von 0,5 mg Protein/ml bei niedrigerer $DBMIB_{total}$-Konzentration erreicht würde, aber die gezeigte Tendenz der Reduktion bliebe unverändert.

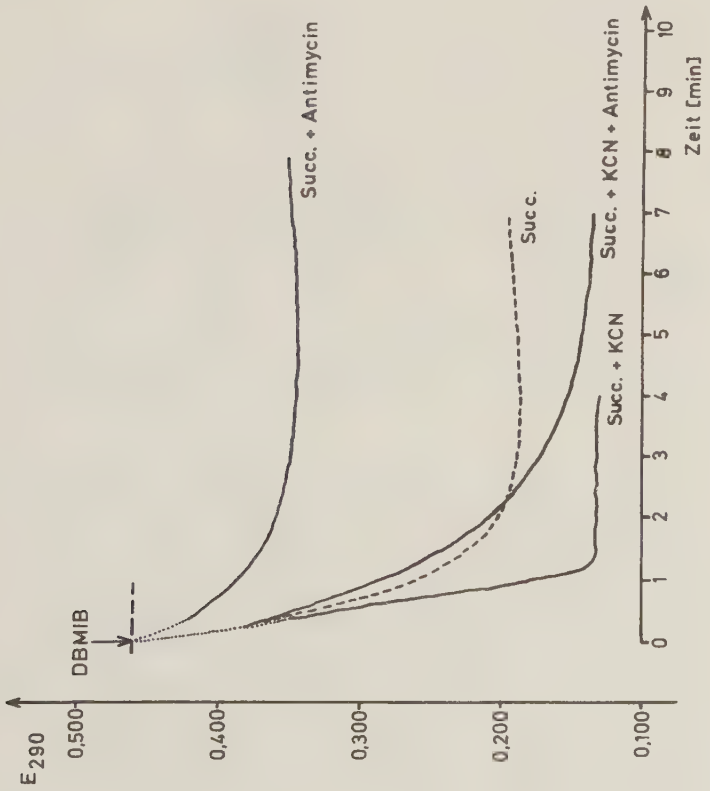
(Abb. 32: Fortsetzung von Seite 120)
berechnet: ε = 10,4 bei 0,1 mg Protein/ml, ε = 8,4 bei 0,3 mg Protein/ml und ε = 6,4 mM^{-1} cm^{-1} bei 0,5 mg Protein/ml Mitochondrienkonzentration.

Durchschnittlich wurde bei einer Mitochondrienkonzentration von 0,15 mg Protein/ml eine DBMIB-Reduktion von 30 nmol $DBMIB_{reduziert}$/mg mitochondrialem Protein bei der poky-Mutante und 26 nmol $DBMIB_{reduziert}$/mg mitochondrialem Protein bei Neurospora-Wildstamm mit Succinat als Substrat gemessen. In Anwesenheit von Succinat und KCN lagen die entsprechenden Werte bei 34 bzw. 35 nmol $DBMIB_{reduziert}$/mg mitochondrialem Protein.

DBMIB-Reduktion konnte auch mit Citrat plus Malat als Substrat beobachtet werden, die quantitative Auswertung ist aber in diesem Falle noch schwieriger, weil das entstehende NADH auch zur Absorptionsänderung beitragen kann.

Die Abhängigkeit der DBMIB-Reduktion von der Anwesenheit von Inhibitoren der Atmungskette zeigt Abbildung 33. In den Proben, die mit Succinat plus KCN (plus Antimycin) versehen waren, wurden mehr als 70%, mit Succinat alleine mehr als 55%, mit Succinat plus Antimycin etwas mehr als 25% der zugegebenen DBMIB-Menge reduziert. Die Geschwindigkeit der Reduktion war am größten in Anwesenheit von Succinat und KCN, zusätzliche Antimycin-Zugabe verlangsamte die Reduktion erheblich, hatte aber keinen Einfluß auf die maximal reduzierbare DBMIB-Menge. Die Herabsetzung der Reduktionsgeschwindigkeit durch Antimycin bzw. die geringfügige DBMIB-Reduktion in Anwesenheit von Succinat und Antimycin deutet

Abb. 33 Abhängigkeit der DBMIB-Reduktion von der Anwesenheit von Atmungsketten-Inhibitoren.
Die Mitochondrien wurden mit 15 mM Succinat und den angegebenen Inhibitoren (KCN 1,5 mM bzw. Antimycin 0,5 µg/mg Protein) 5 Minuten vorinkubiert, nach Zugabe von DBMIB (33 µM $DBMIB_{total}$ zu 0,3 mg Protein/ml Mitochondrien) wurde die Extinktionsabnahme bei 290 nm gegenüber oxidierten Mitochondrien verfolgt.



auf eine Antimycin-Hemmung der DBMIB-Reduktion hin.

In Anwesenheit von Succinat bzw. Succinat plus Antimycin konnte eine Oxidation des reduzierten DBMIB ohne Malonat-Zugabe beobachtet werden. In KCN-gehemmten Mitochondrien dagegen blieb die reduzierte Menge während 3 Minuten konstant.

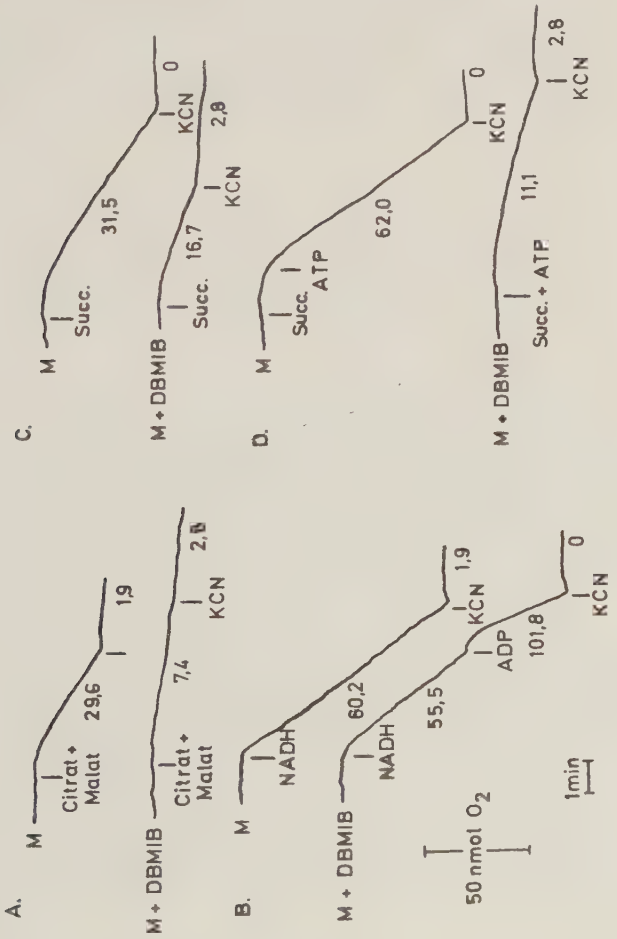
E.3.2.3.2. Sauerstoffverbrauch bei DBMIB-Autoxidation

Im vorhergehenden Kapitel wurde gezeigt, daß DBMIB in Neurospora Mitochondrien reduziert wird und autoxidieren kann. Auf Grund der spektroskopischen Bestimmung der Autoxidationsgeschwindigkeit dürften die durch DBMIB-Autoxidation verursachten Sauerstoffverbrauchsraten so niedrig liegen, daß sie durch Messungen mit der Sauerstoffelektrode möglicherweise nicht erfaßt werden können.

Diese Vermutung wurde durch Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsraten mittels einer Sauerstoffelektrode bestätigt (Abbildung 34). Die maximale Sauerstoffverbrauchsrate in KCN- und DBMIB-gehemmten Mitochondrien betrug 2,8 nmol O_2/mg Protein/min, was unter den gegebenen Bedingungen einer Steigung von 0,3-0,5 vertikalen Einheiten entspricht, und liegt damit unter der Fehlergrenze der Methode. Nachträgliche DBMIB-Zugabe zu KCN- oder KCN- und Antimycin-gehemmten Mitochondrien ver-

Abb. 34 DBMIB-Hemmung der Atmung in Mitochondrien des Neuropora Wildstammes.

Die Mitochondrienkonzentration betrug 0,3 mg Protein/ml, die Mitochondrien wurden 5 Minuten mit 33 uM DBMIB in Respirationsmedium (pH=7,2) vorinkubiert. Die Substrat- und Inhibitorkonzentrationen waren: Citrat 15 mM; Malat 1,5 mM; NADH 1,5 mM; ADP 1 mM; Succinat 15 mM; ATP 1 mM und KCN 1,5 mM. Die Zahlenangaben an den Kurvenabschnitten bedeuten nmol O_2 Verbrauch pro Minute und mg mitochondrialem Protein.



ursachte keinen zusätzlichen Sauerstoffverbrauch. Die bei Abbildung 34 verwendete $DBMIB_{total}$-Konzentration (33µM DBMIB bei einer Mitochondrienkonzentration von 0,3 mg Protein/ml) verursachte eine 56%-ige Hemmung der Atmung mit Succinat als Substrat, 87%-ige Hemmung mit Succinat plus ATP und 87%-ige Hemmung mit Citrat als Substrat. Wenn exogenes NADH das Substrat war, konnte keine DBMIB-Hemmung beobachtet werden, die Atmung konnte sogar durch ADP-Zugabe gesteigert werden.

Obwohl die Sauerstoffverbrauchsraten der DBMIB-Autoxidation unter normalen Messbedingungen für die Erfassung mit der Sauerstoffelektrode zu niedrig liegen, kann der gesamte Sauerstoffverbrauch der DBMIB-Autoxidation, insbesondere in Anwesenheit von KCN, mit der Sauerstoffelektrode bestimmt werden. Um das reduzierte DBMIB für Sauerstoff besser zugänglich zu machen, wurden die Mitochondrien nach erfolgter DBMIB-Reduktion mit KOH versetzt (pH-Schock) und so das pH der Suspension von 7,2 nach 8,5 verschoben.

Abbildungen 35-36 zeigen die DBMIB-Autoxidation nach pH-Schock in Mitochondrien des Neurospora Wildstammes, wenn Succinat, Citrat bzw. exogenes NADH als Substrate für die Atmungskette und DBMIB-Reduktion verwendet worden waren. Eine sprunghafte Abnahme der Sauerstoffkonzentration der Mitochondrien-Suspension nach KOH-Zugabe kann sowohl in Anwesenheit von Succinat (Abb.

35) als auch in Anwesenheit von Citrat (Abb. 36) in den mit DBMIB-behandelten Proben (mit und ohne KCN) beobachtet werden. Bei den unbehandelten Kontrollen rief KOH-Zugabe keinen Sauerstoffverbrauch hervor. Wenn Succinat das Substrat war, zeigte sich in den DBMIB-behandelten Proben nach der sprunghaften Abnahme nach KOH-Gabe weiterer kontinuierlicher Sauerstoffverbrauch, der durch Zugabe von Atmungsketteninhibitoren (KCN und Antimycin) gesteigert werden konnte (Abb. 35, Kurven 1 und 3). Mit exogenem NADH als Substrat (Abb. 37) konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob DBMIB vor KOH-Zugabe reduziert wurde, weil die Autoxidation nach pH-Schock sehr schnell war (250 bzw. 360 nmol O_2/min/mg Protein). Neben einem so großen Sauerstoffverbrauch war es nicht möglich, eine zusätzliche Abnahme von 10-30 nmol O_2 (wie bei den anderen Substraten) nachzuweisen. Die nach KCN-Zugabe beobachtete Abnahme der Sauerstoffverbrauchsrate in Gegenwart von exogenem NADH (Abb. 37, Kurve 3) wurde nicht durch eine KCN-Hemmung der Autoxidation verursacht, sondern wahrscheinlich dadurch, daß die Sauerstoffkonzentration der Suspension wegen der raschen DBMIB-Autoxidation so stark herabgesetzt wurde, daß sie die Reaktionsgeschwindigkeit limitierte (vgl. Kurven 2 und 3 in Abb.37).

Wenn das pH des Respirationsmediums vor der Inkubation auf 8,45 eingestellt wurde, war die Atmung mit Succinat als Substrat 40% niedriger als bei pH=7,2.

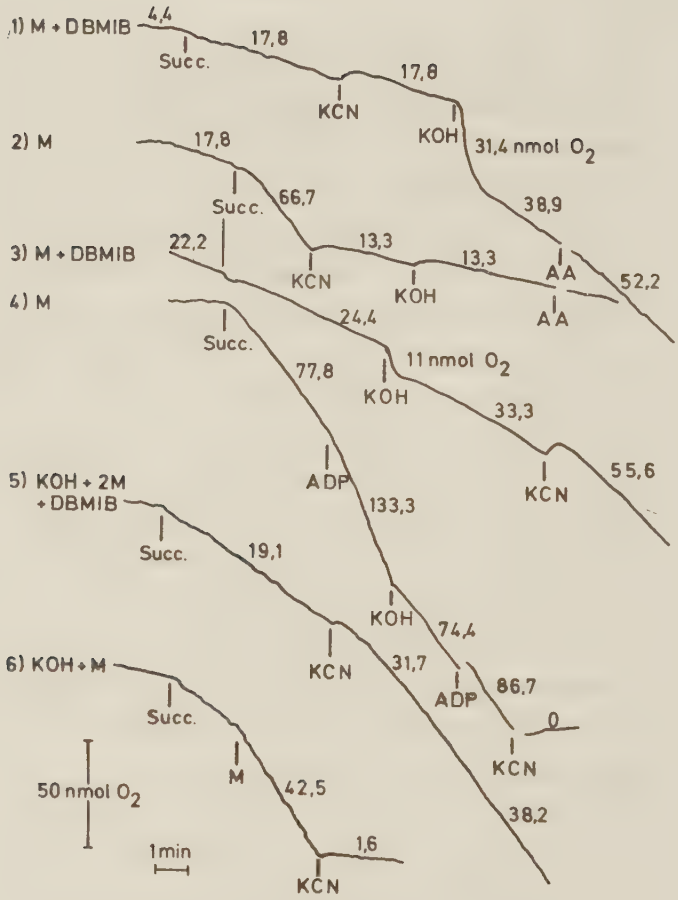


Abb. 35 DBMIB-Autoxidation nach pH-Schock in Mitochondrien des Neurospora crassa Wildstammes in Anwesenheit von Succinat als Substrat.

Mitochondrien in einer Konzentration von 0,3 mg Protein /ml (M, Kurve 1-4) bzw. 0,61 mg Protein/ml (2M, Kurve 5 und 6) wurden in Respirationsmedium mit oder ohne 100 µM DBMIB 10 Minuten auf Eis und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der pH des Mediums wurde bei den Kurven 5 und 6 von 7,2 nach 8,45 verschoben. Die Substrat- und Inhibitorkonzentrationen waren:
(Fortsetzung: s. Seite 129)

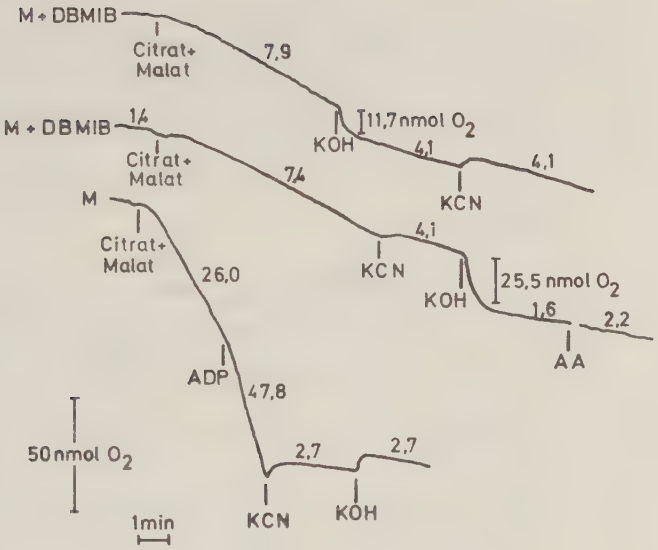


Abb. 36 DBMIB-Autoxidation nach pH-Schock in Mitochondrien des Neurospora crassa Wildstammes in Anwesenheit von Citrat als Substrat.
Mitochondrien in einer Konzentration von 1,2 mg Protein/ml wurden in Respirationsmedium bei pH 7,2 mit oder ohne 100 µM DBMIB wie bei Abbildung 35 inkubiert. Die Citratkonzentration betrug 15 mM, Malatkonzentration 1,5 mM, in übrigen treffen die Angaben bei Abbildung 35 zu.

(Abb. 35: Fortsetzung von S. 128)
Succinat 15 mM; ADP 1,5 mM; KCN 1,5 mM; Antimycin(=AA) 0,7 µg/mg Protein. KOH (1 M) wurde in 10 µl Volumen mit einem Hamilton-Spritzen der Suspension hinzugefügt, so daß kein zusätzlicher Sauerstoff in die Suspension gelangte. Diese Vorsichtsmaßnahme wurde bei der Zugabe von anderen Substanzen nicht durchgeführt. Die Zahlenangaben (ohne Dimension) an den Kurvenabschnitten bedeuten nmol O_2 Verbrauch pro Minute und mg mitochondrialem Protein.

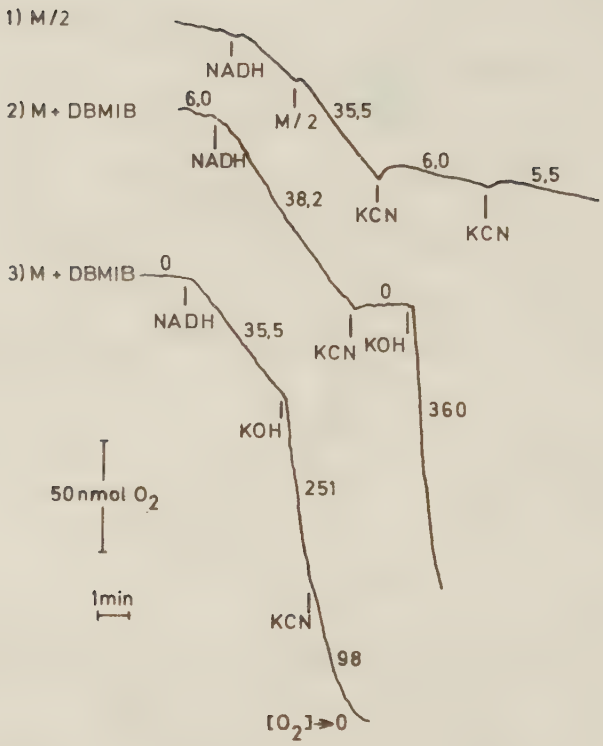


Abb. 37 DBMIB-Autoxidation nach pH-Schock in Mitochondrien des Neurospora crassa Wildstammes in Anwesenheit von exogenem NADH (1,5 mM) als Substrat.

Mitochondrien in einer Konzentration von 0,62 mg Protein/ml (M) wurden in Respirationsmedium mit oder ohne 100 µM DBMIB 10 Minuten auf Eis und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die KCN-Konzentration betrug 1,5 mM, KOH (1 M) wurde in 10 µl Volumen mit einer Hamilton-Spritze der Suspension (1,3 ml) hinzugefügt.

Der durch das erhöhte pH verminderte Sauerstoffverbrauch konnte mit DBMIB zu 50% weiter gehemmt werden, KCN-Zugabe verursachte jedoch bei den DBMIB-behandelten Proben

keine Hemmung, sondern erhöherte die Sauerstoffverbrauchsrate (Abb.35, Kurven 5 und 6). Die Sauerstoffverbrauchsrate in Anwesenheit von DBMIB, Succinat und KCN war gut vergleichbar mit der in Anwesenheit von nur Succinat bei pH=8,45 (38,2 bzw. 42,6 nmol O_2/min /mg Protein).

Weil es nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob DBMIB durch exogenes NADH als Substrat vor KOH-Zugabe reduziert werden kann, und weil DBMIB die Atmung mit exogenem NADH auch nicht hemmt, wurde DBMIB mit Succinat als Substrat reduziert und in Anwesenheit von Malonat der Sauerstoffverbrauch mit exogenem NADH gemessen. Eine DBMIB-Hemmung der Atmung mit exogenem NADH als Substrat konnte durch die obige Vorbehandlung nicht hervorgerufen werden (Daten nicht abgebildet).

E.3.2.4. Einfluß des DBMIB auf den Redoxzustand von verschiedenen Komponenten der Atmungskette

Mehrere Arbeitsgruppen beschrieben, daß DBMIB in Mitochondrien, SMP oder E.coli-Membranpartikeln mit blockierter Endoxidase eine vorübergehende Cytochrom b-Oxidation verursachen kann (LOSCHEN und AZZI 1974, POOLE und HADDOCK 1975, SURKOV und KONSTANTINOV 1980). LOSCHEN und AZZI (1974) beobachteten die Cytochrom b-Oxidation

unter Bedingungen, wo DBMIB den Elektrontransport stark hemmte und keine DBMIB-Autoxidation (Sauerstoffverbrauch!) nachgewiesen wurde. Diese Beobachtung führte zu der ursprünglichen Annahme, daß DBMIB ein kompetitiver Inhibitor der Atmungskette bei Ubichinon sei. Die anderen Autoren fanden keinen Zusammenhang zwischen der DBMIB-Hemmung und der Cytochrom b-Oxidation, konnten jedoch die Rückreduktion des Cytochrom b mit der Autoxidation des DBMIB korrelieren. SURKOV und KONSTANTINOV (1980) berichteten von einem potenzierenden Effekt des Antimycins.

Die DBMIB-verursachten spektralen Änderungen wurden in Mitochondrien von Neurospora crassa untersucht, um in die Wechselwirkungen zwischen DBMIB und den Komponenten der Atmungskette bessere Einsicht zu gewinnen.

E.3.2.4.1. Spektrale Änderungen nach DBMIB-Zugabe

E.3.2.4.1.1. In Anwesenheit von Substrat und KCN bzw. Substrat + KCN + Antimycin

In Übereinstimmung mit anderen Autoren (LOSCHEN und AZZI 1974, SURKOV und KONSTANTINOV 1980) wurde nachgewiesen, daß DBMIB-Zugabe zu Cyanid-gehemmten Neurospora-

Mitochondrien in Anwesenheit von Succinat oder Citrat als Substrat eine vorübergehende Oxidation von Cytochrom b verursacht. In Anwesenheit von Cyanid und Antimycin war die reversible Cytochrom b-Oxidation mit den obigen Substraten ebenfalls zu beobachten (Abbildung 38), wie es für SMP aus Rinderherz berichtet wurde (SURKOV und KONSTANTINOV 1980). Mit exogenem NADH wurde keine Cytochrom b-Oxidation beobachtet, wobei die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden kann, daß eine sehr rasch ablaufende Reaktion aus zeitlichen Gründen nicht erfasst wurde (Abb. 38B).

In Anwesenheit von Antimycin wurde neben der Cytochrom b-Oxidation nach DBMIB-Zugabe zusätzlich eine Cytochrom c-Reduktion gefunden (Abb. 38A,C,D). In KCN-gehemmten, durch Substrat reduzierten Kontroll-Mitochondrien bewirkte Antimycin unter aeroben Bedingungen die partielle Oxidation von Cytochrom c. DBMIB scheint den Antimycin-Block aufzuheben oder umgehen zu können und dadurch die vollständige Reduktion von Cytochrom c zu erlauben. In nur mit Cyanid gehemmten Mitochondrien, wo Cytochrom c bereits vollreduziert vorliegt, wurde nach DBMIB-Zugabe bei Cytochrom c keine Änderung beobachtet (nicht abgebildet).

Die beiden DBMIB-Effekte, Cytochrom b-Oxidation und Cytochrom c-Reduktion, waren reversibel, wobei das Erreichen des Ausgangstadiums von den Atmungsraten abhängig war (vgl. Abb. 38C und D, wo die Atmungsraten mit

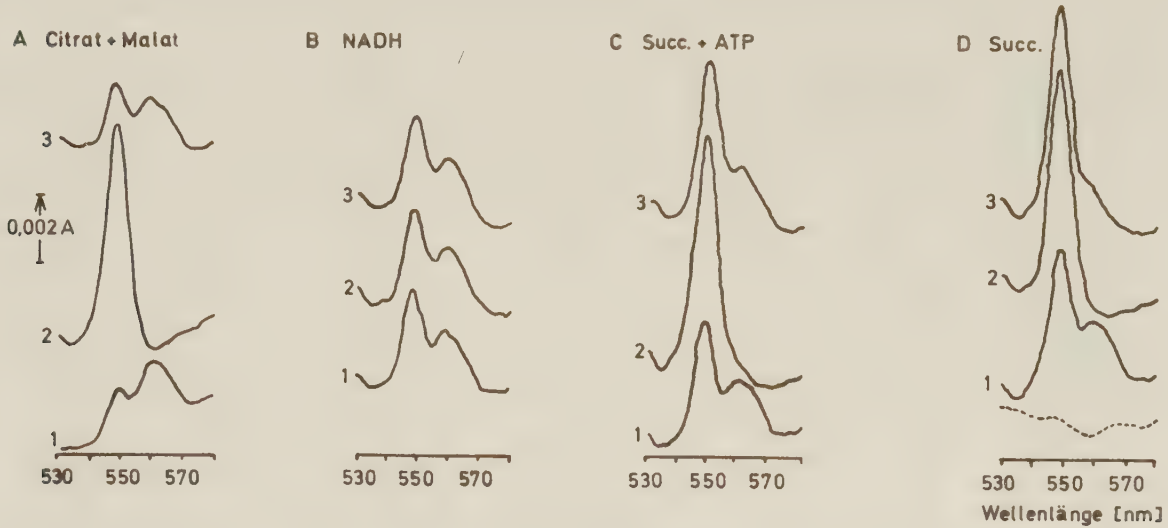


Abb. 38 Spektrale Änderungen in Cyanid- und Antimycin-gehemmten Mitochondrien des Neuropspora Wildstammes nach DBMIB-Zugabe.
Die Mitochondrienkonzentration betrug 0,3mg Protein/ml, die Substrat- und Inhibitorkonzentrationen waren: Citrat 15 mM; Malat 1,5 mM; NADH 1,5 mM; Succinat 15 mM; ATP 1 mM; KCN 1,5 mM; Antimycin 0,5 µg/mg Protein und DBMIB 33 µM. Spektrum 1 wurde nach 5 Minuten Vorinkubation der Probe mit Substrat plus KCN plus Antimycin aufgenommen; Spektrum 2 und 3, ein bzw. 5,5 Minuten nach DBMIB-Zugabe gegen oxidierte Mitochondrien. Die gestrichelte Linie ist die Grundlinie.

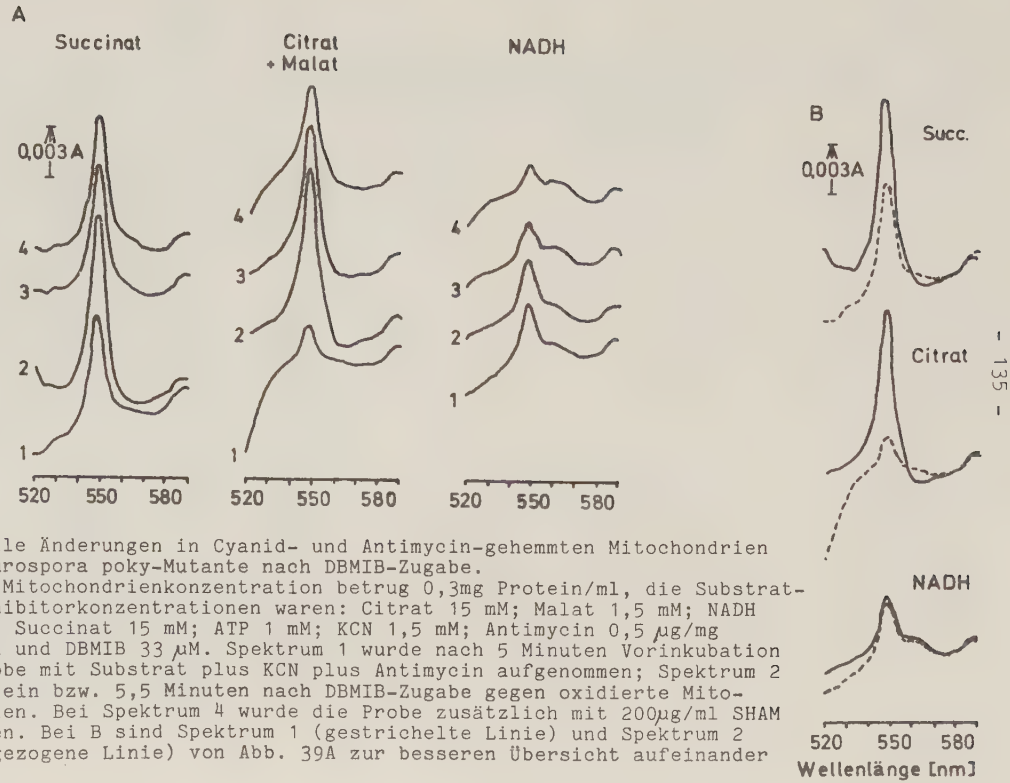


Abb. 39 Spektrale Änderungen in Cyanid- und Antimycin-gehemmten Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante nach DBMIB-Zugabe.

Die Mitochondrienkonzentration betrug 0,3mg Protein/ml, die Substrat- und Inhibitorkonzentrationen waren: Citrat 15 mM; Malat 1,5 mM; NADH 1,5 mM; Succinat 15 mM; ATP 1 mM; KCN 1,5 mM; Antimycin 0,5 µg/mg Protein und DBMIB 33 µM. Spektrum 1 wurde nach 5 Minuten Vorinkubation der Probe mit Substrat plus KCN plus Antimycin aufgenommen; Spektrum 2 und 3, ein bzw. 5,5 Minuten nach DBMIB-Zugabe gegen oxidierte Mitochondrien. Bei Spektrum 4 wurde die Probe zusätzlich mit 200µg/ml SHAM versehen. Bei B sind Spektrum 1 (gestrichelte Linie) und Spektrum 2 (durchgezogene Linie) von Abb. 39A zur besseren Übersicht aufeinander gelegt.

Succinat alleine 31,5, mit Succinat plus ATP 62,0 nmol O_2/min/mg Protein betrugen).

Die DBMIB-Hemmung der Atmung unter identischen Bedingungen ist in Abbildung 34 dargestellt.

DBMIB verursachte in den Mitochondrien der poky-Mutante dieselben Änderungen bei Cytochrom b und c, wie in Mitochondrien des Wildstammes, aber wegen des niedrigen Cytochrom b-Gehaltes der poky-Mitochondrien war der Effekt bei Cytochrom b sehr gering (Abbildung 39A und B).

Außer Cytochrom b-Oxidation und Cytochrom c-Reduktion wurde in Neurospora-Mitochondrien in Anwesenheit von Succinat oder Citrat durch DBMIB-Zugabe, zumindest in Anwesenheit von Malonat, eine Absorptionszunahme im Absorptionsbereich der Flavoproteine (und Karotinoide) hervorgerufen (Abb. 40); Cytochrom c und Cytochrom-Oxidase blieben reduziert oder wurden weiter aufreduziert.

Mit exogenem NADH als Substrat wurde durch DBMIB-Zugabe in Anwesenheit von KCN und Antimycin bei Wild-Mitochondrien keine Absorptionsänderung bei 450-500 nm hervorgerufen.

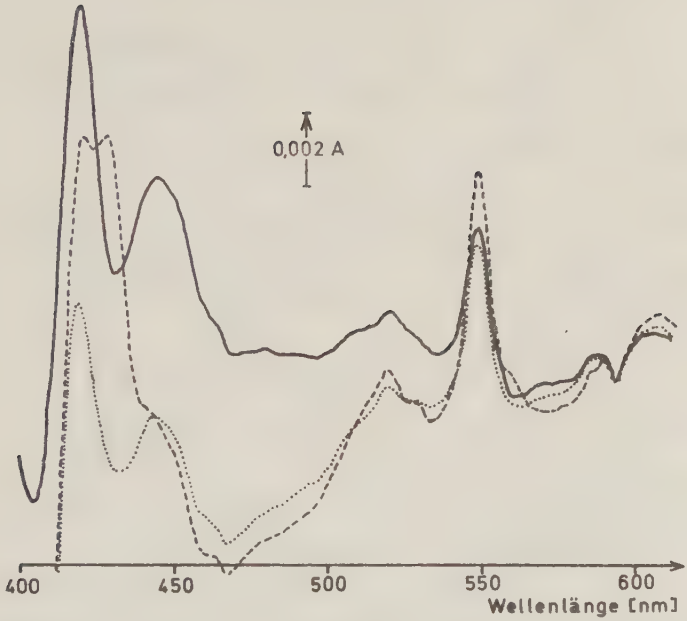


Abb. 40 Spektrale Änderungen im Absorptionsbereich der Flavoproteine nach DBMIB-Zugabe in Mitochondrien des Neurospora Wildstammes.

Die Spektren wurden gegen oxidierte Mitochondrien aufgenommen. Die Mitochondrien (0,3 mg Protein/ml) wurden mit Succinat 15 mM und KCN 1,5 mM 5 Minuten vorinkubiert (Spektren - - - mit gestrichelter Linie). Nach der Vorinkubation wurden die Proben mit 15 mM Malonat versetzt und eine Minute nach Malonat-Zugabe das Spektrum (·····) mit punktierter Linie aufgenommen. Die Proben waren anschließend mit 33 µM DBMIB versehen. Das Spektrum (———) mit durchgezogener Linie wurde 30 Sekunden nach DBMIB-Zugabe aufgenommen.

E.3.2.4.1.2. Spektrale Änderungen nach DBMIB-Zugabe unter anderen Bedingungen

Unter E.3.2.3.1. wurde gezeigt, daß Antimycin in Anwesenheit von KCN und Succinat die Geschwindigkeit der DBMIB-Reduktion mindert, und daß es in Abwesenheit von KCN die maximal reduzierbare DBMIB-Menge herabsetzt (Abb. 33). Die Untersuchung des DBMIB-Einflusses auf die Antimycin-verursachte Cytochrom b-566-Reduktion ergab, daß, wenn Mitochondrien mit DBMIB vorinkubiert wurden, Antimycin-Zugabe in Anwesenheit von Citrat als Substrat keine sofortige Cytochrom b-566-Reduktion auslösen konnte (Abbildung 41A). In Abwesenheit von DBMIB bzw. mit exogenem NADH als Substrat auch nach Vorinkubation mit DBMIB wurde durch Antimycin die übliche Cytochrom b-Reduktion hervorgerufen (Abbildung 41B,C,D).

Die direkte Wirkung der Salicylhydroxamsäure, eines Inhibitors der alternativen Oxidase, auf die DBMIB-Reduktion konnte wegen der hohen UV-Absorption der SHAM nicht untersucht werden. Unter der Annahme, daß die Cytochrom c-Reduktion nach DBMIB-Zugabe in poky-Mitochondrien mit der DBMIB-Reduktion in Zusammenhang steht, wurde es versucht, auf eine mögliche SHAM-Wirkung bei der DBMIB-Reduktion indirekt, durch Untersuchung der Änderung des Redoxzustandes von Cytochrom c nach DBMIB-Zugabe in Anwesenheit von SHAM Rückschlüsse zu ziehen. Es wurde untersucht,

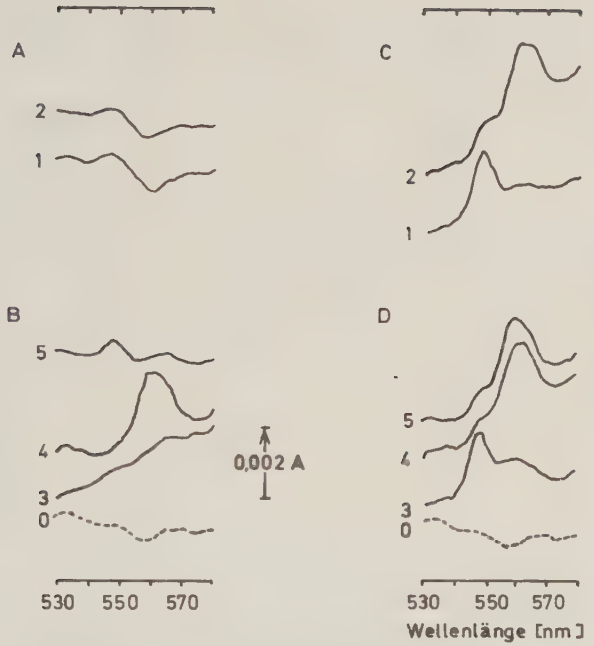


Abb. 41 DBMIB-Einfluß auf die Cytochrom b-Reduktion in Anwesenheit von Antimycin bei Wild-Mitochondrien der Neurospora.

Die Mitochondrienkonzentration betrug 0,3 mg Protein/ml, die Substrate waren 1,5mM NADH bei C und D bzw. 15 mM Citrat (plus 1,5mM Malat) bei A und B. Bevor das Spektrum 1 aufgenommen wurde, wurden die Mitochondrien mit 33 µM DBMIB 3 Minuten, dann zusätzlich mit dem Substrat 5 Minuten vorinkubiert (Spektrum 1). Zu dieser Probe wurde Antimycin (0,5 µg/mg Protein) zugegeben, und 1,5-2 Minuten später das Spektrum 2 aufgenommen. Die Kontrollen (B und D) wurden mit Substrat 5 Minuten vorinkubiert (Spektrum 3) darauf folgend mit Antimycin (Spektrum 4) und DBMIB (Spektrum 5,1 bis 1,5 Minuten nach DBMIB-Zugabe) versetzt. Die gestrichelte Linie ist die Grundlinie (0). Alle Spektren wurden gegen oxidierten Mitochondrien aufgenommen.

ob (1) SHAM in Anwesenheit von KCN und Antimycin den in Abb. 39 gezeigten DBMIB-Effekt zu verändern vermag und ob (2) in Anwesenheit nur von SHAM und Substrat eine Cytochrom c-Reduktion nach DBMIB-Gabe zu beobachten ist.

Der Vergleich der im sichtbaren Wellenlängenbereich 20-45 Sekunden nach DBMIB-Zugabe aufgenommenen Spektren ergab, daß die Spektren der durch KCN und Antimycin (nicht abgebildet, s. aber Abb. 39) bzw. KCN plus Antimycin plus SHAM gehemmten Mitochondrien (Abb. 42-44, Spektren mit durchgezogener Linie) bei den einzelnen Substraten untereinander identisch waren (in Abwesenheit von SHAM konnte geringfügig mehr Cytochrom c-Reduktion beobachtet werden, der Unterschied war aber so gering wie etwa der der mit durchgezogenen und punktieren Linien dargestellten Spektren in Abbildung 42).

Wenn DBMIB in Anwesenheit nur von Substrat und SHAM zugegeben wurde, wurde Cytochrom c mit Succinat als Substrat in demselben Maße reduziert wie in Anwesenheit von KCN und Antimycin (Abb. 42). Mit Citrat als Substrat wurde nur sehr schwache Cytochrom c-Reduktion, aber eine Extinktionszunahme bei 400-500 nm durch DBMIB-Zugabe hervorgerufen (Abb. 43). Mit exogenem NADH als Substrat, wo in Anwesenheit von KCN und Antimycin keine Cytochrom c-Reduktion nachgewiesen werden konnte, verursachte DBMIB in Anwesenheit von SHAM alleine eine ähnlich hohe Cytochrom c-Reduktion (Abb. 44) wie bei den durch Succinat reduzierten Mitochondrien.

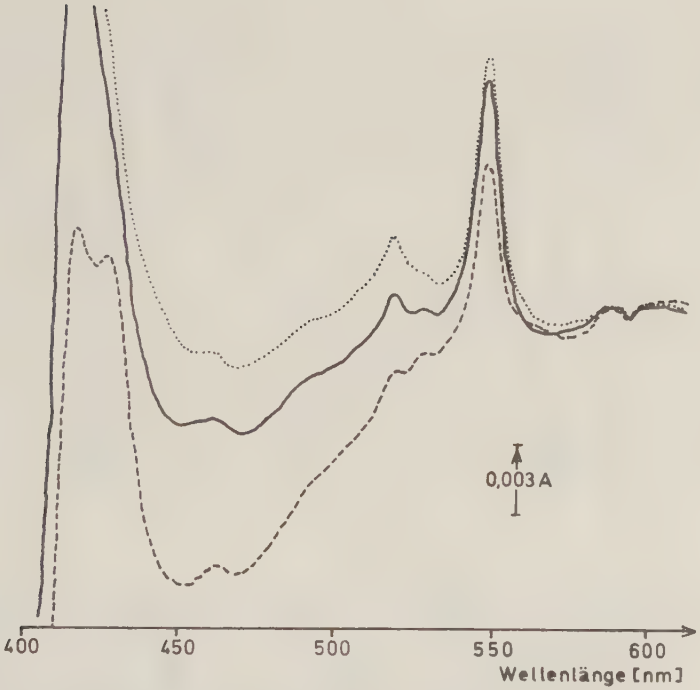


Abb. 42 Beeinflussung der DBMIB-Wirkung auf den Redoxzustand der Komponenten der Atmungskette durch Hemmung der alternativen Oxidase in Mitochondrien der poky-Mutante in Anwesenheit von Succinat als Substrat.

Alle Spektren wurden gegen oxidierte Mitochondrien aufgenommen, die Miochondrienkonzentration betrug 0,3 mg Protein/ml. Die Proben wurden wie folgt behandelt:

(a) Spektrum ·····: vorinkubiert mit Succinat 15 mM und SHAM 200 µg/ml, dann versetzt mit 33 µM DBMIB und 45 Sekunden später das Spektrum aufgenommen.

(b) Spektrum ——: vorinkubiert mit Succinat 15 mM, KCN 1,5 mM, Antimycin 0,5 µg/mg Protein und SHAM 200 µg/ml, dann versetzt mit 33 µM DBMIB und 45 Sekunden später das Spektrum aufgenommen.

(c) Spektrum - - - -: das Spektrum wurde nach Vorinkubation mit Succinat (15 mM), KCN 1,5 mM, Antimycin 0,5µg/mg Protein und SHAM 200 µg/ml aufgenommen.

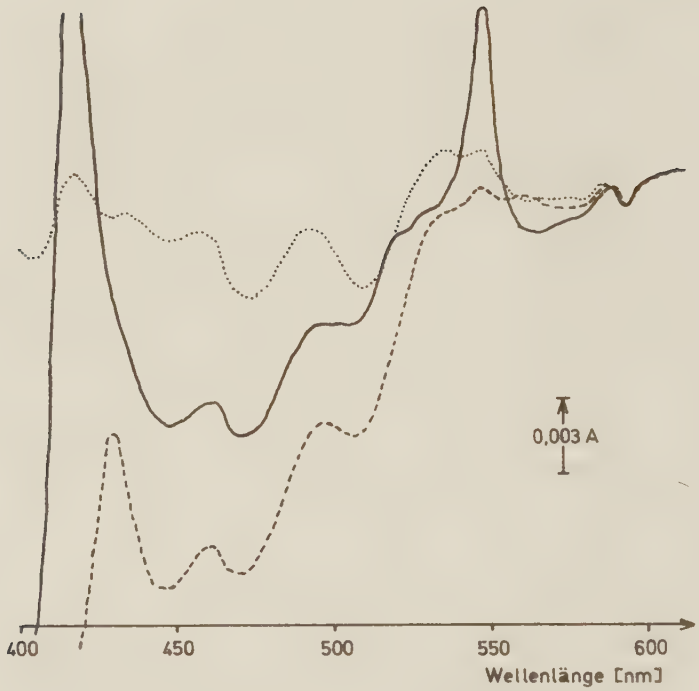


Abb. 43 Beeinflussung der DBMIB-Wirkung auf den Redoxzustand der Komponenten der Atmungskette durch Hemmung der alternativen Oxidase in Mitochondrien der poky-Mutante in Anwesenheit von Citrat als Substrat.

Alle Spektren wurden gegen oxidierte Mitochondrien aufgenommen, die Mitochondrienkonzentration betrug 0,3 mg Protein/ml. Die Proben wurden wie folgt behandelt:

(a) Spektrum.....: vorinkubiert mit Citrat 15 mM plus Malat 1,5 mM und SHAM 200 µg/ml, dann versetzt mit 33 µM DBMIB und 45 Sekunden später das Spektrum aufgenommen.

(b) Spektrum ——: vorinkubiert mit Citrat 15 mM plus Malat 1,5 mM, KCN 1,5 mM, Antimycin 0,5 µg/mg Protein und SHAM 200 µg/ml, dann versetzt mit 33 µM DBMIB und 45 Sekunden später das Spektrum aufgenommen.

(c) Spektrum- - - -: das Spektrum wurde nach Vorinkubation mit Citrat 15mM plus Malat 1,5mM, KCN 1,5 mM, Antimycin 0,5µg/mg Protein und SHAM 200 µg/ml aufgenommen.

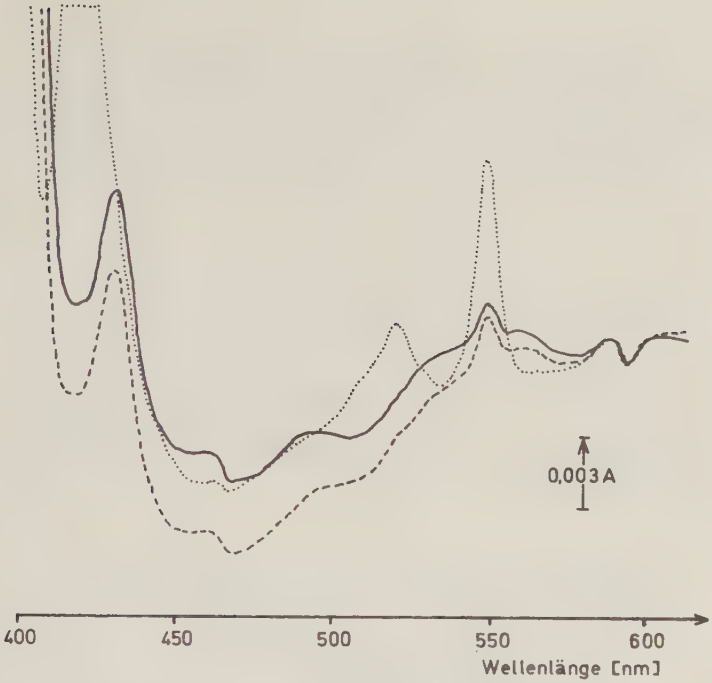


Abb. 44 Beeinflussung der DBMIB-Wirkung auf den Redoxzustand der Komponenten der Atmungskette durch Hemmung der alternativen Oxidase in Mitochondrien der poky-Mutante in Anwesenheit von exogenem NADH als Substrat.

Alle Spektren wurden gegen oxidierten Mitochondrien aufgenommen, die Miochondrienkonzentration betrug 0,3 mg Protein/ml. Die Proben wurden wie folgt behandelt:

(a) Spektrum ·····: vorinkubiert mit NADH 2mM und SHAM 200 µg/ml, dann versetzt mit 33 µM DBMIB und 45 Sekunden später das Spektrum aufgenommen.

(b) Spektrum ——— : vorinkubiert mit NADH 2 mM, KCN 1,5 mM, Antimycin 0,5 µg/mg Protein und SHAM 200 µg/ml, dann versetzt mit 33 µM DBMIB und 45 Sekunden später das Spektrum aufgenommen.

(c) Spektrum - - - - -: das Spektrum wurde nach Vorinkubation mit NADH (2 mM), KCN 1,5 mM, Antimycin 0,5µg/mg Protein und SHAM 200 µg/ml aufgenommen.

Die Cytochrom c-Reduktion nach DBMIB-Zugabe in SHAM-gehemmten poky-Mitochondrien mit Succinat bzw. mit exogenem NADH als Substrat kann nicht durch die Nicht-Hemmung der normalen Atmungskette verursacht werden, weil zumindest in Wild-Mitochondrien ein ähnlicher DBMIB-Effekt in Anwesenheit von Substrat alleine nicht beobachtet wurde (vgl. auch Spektren A1 und C1, bzw. B5 und D5 bei Abbildung 41).

Diese Ergebnisse sind vorbereitende Ergebnisse; der zeitliche Verlauf der Reaktionen sollte durch kinetische Messungen kontrolliert werden.

E.3.2.4.2. Parallele Redox-Änderungen bei DBMIB, Cytochrom b-560 und Cytochrom c in Neurospora-Mitochondrien

Es wurde gezeigt, daß die Anwesenheit von KCN und/oder Antimycin die Geschwindigkeit und das Ausmaß der DBMIB-Reduktion beeinflußt (E.3.2.3.). Anderseits konnte in KCN-gehemmten Mitochondrien durch DBMIB-Zugabe eine reversible Cytochrom b-Oxidation, in Anwesenheit von KCN und Antimycin zusätzlich eine Cytochrom c-Reduktion hervorgerufen werden (E3.2.4.1.). SURKOV und KONSTANTINOV (1980) berichteten außerdem, daß die Anwesenheit von Antimycin die DBMIB-verursachte Cytochrom b-Oxidation steigerte. Die Spektren der Neurospora-Mito-

chondrien zeigten nach DBMIB-Zugabe mit und ohne Antimycin keine deutlichen Unterschiede in der Oxidation von Cytchrom b-560, der Effekt war jedoch in Anwesenheit von Antimycin über etwas längere Zeit zu beobachten.

Es wurde untersucht, ob die Redox-Änderungen bei DBMIB, Cytochrom b und Cytochrom c zeitlch miteinander korrelierbar sind, und ob der Antimycin-Effekt auf die Cytochrom b-Oxidation (und Rückreduktion) durch eine Beeinflussung der DBMIB-Reduktion erklärt werden könnte.

E.3.2.4.2.1. Redox-Kinetik von DBMIB, Cytochrom b-560 und Cytochrom c in Anwesenheit von KCN

Abbildung 45 zeigt die Redox-Kinetik der oben genannten Komponenten in Mitochondrien des Neurospora-Wildstammes in Anwesenheit von Succinat und KCN. In Anwesenheit von KCN konnte nach DBMIB-Zugabe keine Cytochrom c-Reduktion beobachtet werden, weil Cytochrom c unter diesen Bedingungen bereits reduziert vorlag.Die DBMIB-Reduktion war sehr schnell und eine Minute nach DBMIB-Zugabe nahezu vollendet. Cytochrom b wurde nach DBMIB-Zugabe sofort oxidiert. Die Rückreduktion des Cytochrom b folgte einer Zwei-Phasen-Kinetik: nach einer kurzen lag-Phase erfolgte eine sehr schnelle Rückreduktion während der abklingenden Phase der DBMIB-Reduktion

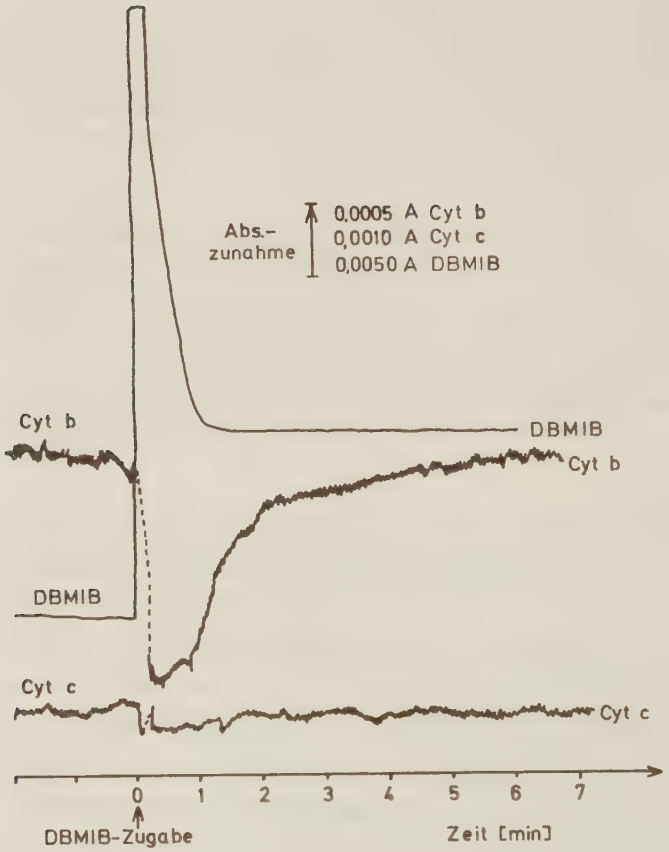


Abb. 45 Redox-Änderungen von DBMIB, Cytochrom b und Cytochrom c in Abhängigkeit von der Zeit nach DBMIB-Zugabe in Mitochondrien des Neurospora Wildstammes in Anwesenheit von Succinat und KCN.
Die Mitochondrien (0,3 mg Protein/ml) wurden in dem üblichen Respirationsmedium mit Succinat (15 mM) und KCN (1,5 mM) vorinkubiert, und bei "0" mit DBMIB in einer Konzentration von 33 µM versehen. Die Redox-Änderungen wurden für Cytochrom b-560 bei 560-575nm, für Cytochrom c bei 550-542nm, für DBMIB bei 290 nm (gegen oxidierte Mitochondrien) verfolgt.

(in der zweiten Minute nach DBMIB-Zugabe), dann eine langsame Einstellung des ursprünglichen Reduktionsgrades.

E.3.2.4.2.2. Redox-Kinetik von DBMIB, Cytochrom b-560 und Cytochrom c in Anwesenheit von KCN und Antimycin

In Anwesenheit von Antimycin wurde das DBMIB erwartungsgemäß viel langsamer reduziert als in Anwesenheit von KCN allein (Abbildung 46). Das nach DBMIB-Zugabe oxidierte Cytochrom b-560 wurde nach einer einfachen Kinetik, mit konstanter Geschwindigkeit wieder reduziert. Der ursprüngliche Reduktionsgrad wurde in Wild-Mitochondrien gleichzeitig mit dem Erreichen des Gleichgewichts der DBMIB-Reduktion erlangt (7 Minuten bei Abb. 46A). Cytochrom c dagegen, nach DBMIB-Zugabe zwar sofort reduziert (0,34 nmol Cytochrom c_{red}/mg Protein, entsprechend 35% des totalen Cytochrom c-Gehalts der Wild-Mitochondrien, bei Abb. 46A), oxidierte nur sehr langsam während der DBMIB- und Cytochrom b-Reduktion und zeigte etwas schnellere Oxidation erst nach 6-7 Minuten (die Zeitangaben sind nur Richtwerte, weil die aktuelle Reaktionsgeschwindigkeit von der Aktivität der Mitochondrien abhängig ist).

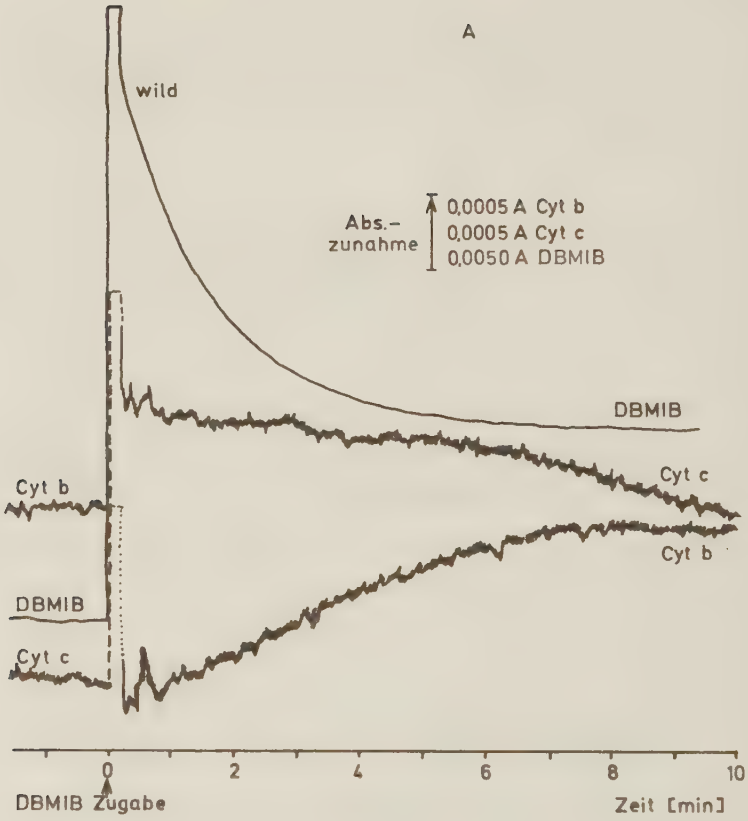
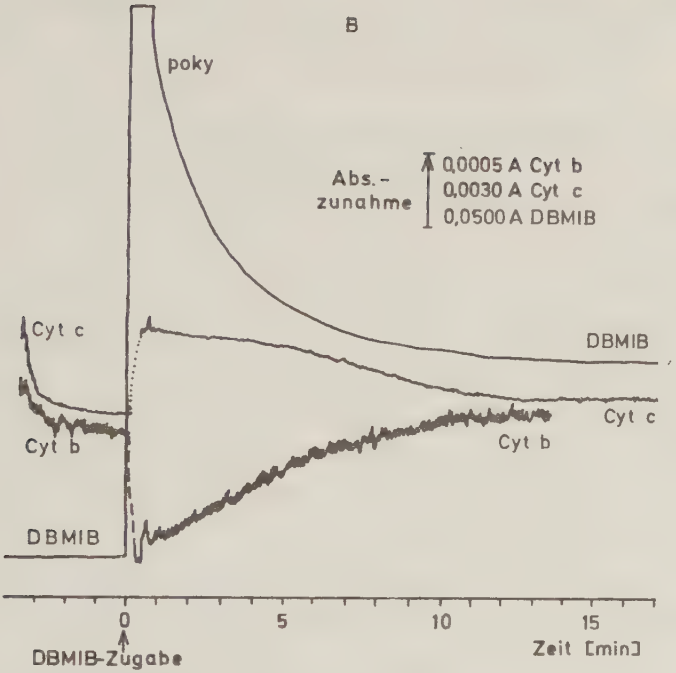


Abb. 46 Redox-Änderungen von DBMIB, Cytochrom b und Cytochrom c in Abhängigkeit von der Zeit nach DBMIB-Zugabe in Mitochondrien des Neurospora Wild(46A) und poky- (46B) Stammes in Anwesenheit von Succinat, KCN und Antimycin.

Die Mitochondrien (0,3 mg Protein/ml) wurden im üblichen Respirationsmedium mit Succinat (15 mM), KCN (1,5 mM) und Antimycin (0,5 µg/mg Protein) vorinkubiert, und bei "0" mit DBMIB in einer Konzentration von 33 µM versehen. Die Redox-Änderungen wurden für Cytochrom b-560 bei 560-575 nm, für Cytochrom c bei 550-542 nm, für DBMIB bei 290 nm (gegen oxidierte Mitochondrien) verfolgt.



(Abb. 46B: Text s. S.148)

Die DBMIB-verursachte Cytochrom b-Oxidation, gemessen bei 560-575 nm entspricht 0,22 nmol Cytochrom b/mg Protein, unabhängig von der Anwesenheit des Antimycins (vgl. Abb. 45 und 46A). Antimycin hatte bei meinen Experimenten (im Gegensatz zum SURKOV und KONSTANTINOV (1980)) nur insofern einen quantitativen Effekt auf die Cytochrom b-Oxidation, als es die Reduktion von Cyto-

chrom b-566 bewirkte, welches nach DBMIB-Zugabe wie Cytochrom b-560 reversibel oxidiert wurde.

Die Redox-Kinetiken von DBMIB, Cytochrom b und Cytochrom c verliefen bei den Mitochondrien der poky-Mutante ähnlich wie bei den Wild-Mitochondrien, aber die DBMIB- und Cytochrom b-560-Reduktion war in poky-Mitochondrien langsamer (Abb. 47B). Die Cytochrom b-Oxidation entsprach 0,13 nmol Cytochrom b/mg Protein, die Cytochrom b-Reduktion 12 Minuten nach DBMIB-Zugabe 0,16 nmol Cytochrom b/mg Protein. DBMIB bewirkte eine weitere Reduktion von weiteren 0,68 nmol Cytochrom c/mg Protein (etwa 38% der gesamten Cytochrom c-Konzentration); somit wurde nach DBMIB-Zugabe wie bei Wild-Mitochondrien das Cytochrom c voll reduziert.

Die zeitliche Parallelität der Redox-Änderungen von DBMIB, Cytochrom b und Cytochrom c deutet darauf hin, daß DBMIB in KCN- bzw. KCN- und Antimycin-gehemmten Neurospora-Mitochondrien überwiegend in der Nähe von Cytochrom b, wahrscheinlich am Q-Zyklus reduziert wird (s. D.3.2.).

DISKUSSION

D.1. Änderung der mitochondrialen Eigenschaften während der Entwicklung der Organismen

In Mitochondrien des Neurospora crassa Wild- und poky-Stammes wurden während des Wachstums qualitative und quantitative Änderungen z.B. in der Empfindlichkeit gegenüber Hemmstoffen usw. gezeigt (E.1.1.). Ein wichtiger Befund war, daß die Mitochondrien aus Mycel in der logarithmischen Phase nicht als statische Population betrachtet werden können, sondern die mitochondrialen Eigenschaften sich auch während der logarithmischen Phase deutlich verändern und daher die in der Literatur beschriebenen Mitochondrien aus der "logarithmischen Wachstumsphase" untereinander nicht identisch sein müssen.

Die bisher nur bei Hefe beschriebene Entwicklung der Rotenon-Empfindlichkeit während des Wachstums (LIGHT et al. 1969, KATZ et al. 1971 und KATZ 1971) konnte auch bei Neurospora nachgewiesen werden. So konnte der Widerspruch über die Rotenon-Sensitivität der Neurospora Mitochondrien (LAMBOWITZ et al. 1972a und WEISS et al. 1970) dadurch erklärt werden, daß bei Mitochondrien des Neurospora Wildstamms die Wendung von der Rotenon-

Insensitivität zur maximalen Rotenon-Hemmbarkeit innerhalb von vier Stunden vollzogen wird.

Die Kenntnis der qualitativen und quantitativen Änderung der mitochondrialen Eigenschaften würde erlauben, Mitochondrien mit den für das jeweilige Ziel des Experiments günstigen Eigenschaften durch unterschiedliche Anzuchtszeiten zu gewinnen. Die gezeigte Änderung des Cyanid-unempfindlichen Anteils der Atmung stimmt mit den Ergebnissen von HASKINS et al. (1953) und KLEIN et al. (1975) überein. Quantitative Änderungen der Sauerstoffverbrauchsraten mit verschiedenen Substraten wurden meines Wissens bei Neurospora-Mitochondrien noch nicht beschrieben. Meine Vorversuche deuteten auch auf eine Änderung der Aktivierbarkeit der Succinat-Dehydrogenase bzw. des Citrattransports hin, sie sollten jedoch durch umfassendere Untersuchungen erhärtet werden.

Diese Beobachtungen könnten eine Grundlage zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen dem Metabolismus der Zelle und den Mitochondrien bei Neurospora crassa bilden. Durchgreifende morphologische Änderungen der Riesenmitochondrien von Euglena gracilis, abhängig von den Wachstumsbedingungen, sind bekannt (PELLEGRINI 1978).

D.2. Neue methodische Ansätze zur Untersuchung der Cyanid-unempfindlichen Atmung

D.2.1. Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung durch Belichtung des Mycels des Wildstamms von Neurospora

Belichtung mit hohen Weißlicht-Intensitäten kann bei dem Cyanid-sensitiven Wildstamm von Neurospora crassa Cyanid-unempfindliche Atmung induzieren (E.2.1.). Ein Wärme-Effekt bei der Induktion konnte nicht ausgeschlossen werden, die Induktion der Cyanid-Unempfindlichkeit ausschließlich durch Wärme ist unter den gegebenen Bedingungen jedoch sehr unwahrscheinlich. Es stellt sich die Frage, wie Licht die Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung bewirken könnte.

Cyanid-resistente Atmung kann bei dem Neurospora Wildstamm durch Zugabe von Inhibitoren der normalen Atmungskette (Cyanid oder Antimycin) in das Kulturmedium induziert werden (LAMBOWITZ und SLAYMAN 1971). Die Induzierbarkeit ist abhängig vom Alter der Kultur, und das Auftreten der Cyanid-unempfindlichen Atmung ist vorübergehender Natur. NINNEMANN et al.(1970) beschrieben, daß Belichtung unter aeroben Bedingungen bei ausgehungerter Saccharomyces cerevisiae die Cytochrom-

Oxidase und teilweise auch die b-Typ Cytochrome zerstören kann. Wenn Licht bei Neurospora ähnlich wie bei Hefe die Atmung über die Cytochrome vermindert, d.h. quasi als Inhibitor der Cyanid-sensitiven Atmungskette wirkte, könnte es dadurch die Synthese der alternativen Oxidase hervorrufen.

Eine direkte derartige Inaktivierung von Cytochromen halte ich bei Neurospora für weniger wahrscheinlich, weil die Cyanid-sensitive Atmung (d.h. der Cyanid-sensitive Sauerstoffverbrauch per ml Kultur) während der Belichtung nicht abzunehmen schien. Eine teilweise Zerstörung der Cytochrom-Oxidase durch Licht könnte jedoch nur durch quantitative Bestimmung der Cytochrom-Oxidase Konzentration vor und während der Belichtung festgestellt werden.

RAMADAN-TALIB und PREBBLE (1978) fanden nach Belichtung von Neurospora Mycel oder Mitochondrien auch keine nennenswerte Photoinaktivierung der Cytochrom-Oxidase, beschrieben aber eine Photoinaktivierung von 20 -60% des NADH-Dehydrogenase- und des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes und die partielle Zerstörung von Ubichinon durch Blaulicht. Photoinaktivierung an den obigen Stellen könnte kaum zur Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung führen, weil nach unseren bisherigen Kenntnissen dadurch der normale und der alternative Atmungsweg gleichermaßen betroffen wären. Zu dem

Unterschied zwischen den Ergebnisse von RAMADAN-TALIB und PREBBLE (1978) und den unter E.2.1. aufgeführten Ergebnisse könnte außer der unterschiedlichen Belichtung auch die niedrige Sauerstoffkonzentration in den Kulturen der o.g. Autoren beigetragen.

Außer durch direkte Hemmung der normalen Atmungskette kann die Cyanid-unempfindliche Atmung beim Neurospora Wildstamm auf verschiedene Art und Weise induziert werden, wobei die Cytochrom-Kette durch die Induktion indirekt beeinträchtigt werden kann, und eine de novo Synthese der alternativen Oxidase (EDWARDS et al. 1974, EDWARDS und UNGER 1978) stattfindet. LAMBOWITZ und ZANNONI (1978) haben eine Liste der bekannten Induktoren der Cyanid-unempfindlichen Atmung zusammengestellt, welche Oligomycin, CCCP (Inhibitor bzw. Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung), Chloramphenicol (spezifischer Inhibitor der mitochondrialen Proteinsynthese, LAMBOWITZ und SLAYMAN 1971, LAMBOWITZ et al. 1972b), Ethidiumbromid (Inhibitor der DNS-Transkription und Replikation, das bei Hefe selektiv zum Verlust der mitochondrialen DNS führt, EDWARDS und ROSENBERG 1976), Cu-Mangel (führt u.a. zu Cytochrom aa_3-Mangel, SCHWAB 1973), Cholin-Mangel (JURETIC 1976) und NH_4^+ (COLVIN et al. 1973) einschließt, in den beiden letzten Fällen ist der Wirkungsmechanismus unbekannt.

Es ist möglich, daß Belichtung ebenfalls nur in-

direkt zur Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung im Neurospora Wildstamm führt. Der Wirkungsmechanismus des Lichts blieb ungeklärt; eine Möglichkeit wäre die Veränderung der Lipidzusammensetzung der Mitochondrien-Membran, wie sie bei Neurospora Mitochondrien von RAMADAN-TALIB und PREBBLE (1978) beschrieben wurde.

D.2.2. Cyanid-insensitive submitochondriale Partikel aus Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum

Bis 1977 war für die Isolierung von Cyanid-resistenten submitochondrialen Partikeln keine geeignete Methode bekannt, weil die Mitochondrien, sobald sie mit Ultraschall, Detergenzien oder osmotischem Schock behandelt wurden, die Fähigkeit verloren, Succinat oder NADH Cyanid-insensitiv und SHAM-sensitiv zu oxidieren. Diese Befunde haben mit dazu beigetragen, daß Hypothesen aufgestellt wurden, wonach keine "alternative Oxidase", sondern Komponenten der normalen Atmungskette (Komplex II (LYR und SCHEWE 1975) bzw. Ubichinon-Autoxidation (RICH und BONNER 1978a und b)) für die Cyanid-resistente Atmung verantwortlich sein sollten.

Durch einen milden pH-Schock nach der Methode von CRANE et al.(1956) konnte ich Cyanid-insensitive submitochondriale Partikel aus Spadix-Mitochondrien von Arum spp. isolieren(E.2.2.)

CAMMACK und PALMER 1977 beschrieben ebenfalls die Isolierung von Cyanid-resistenten SMP aus Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum durch Ultraschallbehandlung. Um die Güte der beiden Isolationsmethoden vergleichen zu können, wurden Angaben über die Atmungseigenschaften der Mitochondrien und SMP aus anderen Veröffentlichungen der Palmer-Gruppe als Referenz herangezogen, weil in der oben genannten Arbeit die Sauerstoffverbrauchsraten nicht angegeben sind. Für Spadix-Mitochondrien wurde eine Succinat-Oxidase-Aktivität von 100-500 (Zusammenfassung von CHAUVEAU 1977), und eine NADH-Oxidase-Aktivität von 610 nmol O_2/mg Protein/min (PASSAM und PALMER 1972) zugrunde gelegt. Bei SMP berichteten HUQ und PALMER (1978a) über eine Succinat-Oxidase-Aktivität von 400-1000 und eine NADH-Oxidase-Aktivität von über 600 nmol O_2/min/mg Protein.

Nach diesen Daten wäre die Succinat-Oxidase-Aktivität in SMP genauso hoch oder bis zu 3-mal höher als in Mitochondrien, und die erzielbare Aktivitätszunahme der NADH-Oxidase in SMP wäre maximal 1,5-fach. Dies würde bedeuten daß die pH-Schock-Methode nach CRANE et al. (1956) bzw. die Ultraschallbehandlung von CAMMACK und PALMER (1977) für die Isolierung von submitochondrialen Partikeln in der Güte vergleichbar und die viel höheren Aktivitäten bei HUQ und PALMER (1978a) dem aktiveren Ausgangsmaterial zu verdanken sind. Der starke Aktivitätsverlust durch Einfrieren und Lagern der Mito-

chondrien sei nochmals hervorgehoben.

Die Versuche zur Isolierung von submitochondrialen Partikeln sollten zeigen, daß (a) Cyanid-resistente Atmung nicht nur in intakten Mitochondrien existieren kann, und (b) die Anwesenheit der Cyanid-resistenten Atmung von der Anwesenheit des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes in Gegensatz zu der Meinung von LYR und SCHEWE (1975) unabhängig ist (vgl. BONNER und RICH 1977). Die partielle Reinigung der alternativen Oxidase (HUQ und PALMER 1978b, RICH 1978) hat seither diese Fragen noch eindeutiger beantwortet.

D.2.3. Zwei Cytochrom c-Spezies in Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora

Im Mycel der poky-Mutante von Neurospora crassa kann der Cytochrom c-Gehalt im Vergleich zum Wildstamm (HASKINS et al. 1953) bis auf das 16-fache während der Cyanid-unempfindlichen Wachstumsphase erhöht werden; die Cytochrom c-Konzentration der poky-Mitochondrien liegt außerdem viel höher als die der Mitochondrien des Wildstammes (vgl. Abb. 2 und 4, auf S. 40 und 46). Der Redox-Zustand des Cytochrom c kann außerdem durch Beeinflussung der Aktivität des Cyanid-insensitiven Atmungsweges verändert werden (eigene Beobachtung, siehe auch

RICH und BONNER 1977). Umgekehrt wäre eine Beeinflussung des Cyanid-insensitiven Atmungsweges durch die erhöhte Cytochrom c-Konzentration auch vorstellbar.

SCOTT und MITCHELL (1969) beschrieben nun die Isolierung von zwei molekularen Spezies von Cytochrom c, Cytochromc_I und c_{II}, aus Mycel der Neurospora poky-Mutante, fanden aber in Mitochondrien nur das Cytochrom c_I. Die Autoren schlossen daraus, daß Cytochrom c_I in Mitochondrien gebunden, Cytochrom c_{II} dagegen in der Zelle frei vorliegt.

Die beiden molekularen Spezies von Cytochrom c, Cytochrom c_I und c_{II}, konnten von mir nicht nur im Mycel, sondern auch in Mitochondrien der poky-Mutante von Neurospora crassa chromatographisch nachgewiesen werden (E.2.3.), die Funktion des Cytochrom c_{II} wurde jedoch nicht geklärt.

Das Verhältnis von Cytochrom c_I und Cytochrom c_{II} war im Mycel und in den Mitochondrien (beide gleichaltrig und in der logarithmischen Wachstumsphase) identisch, die Lage der beiden bei der Elution entsprach den Literaturwerten (SCOTT und MITCHELL 1969). Aus diesem Grund konnte angenommen werden, daß es sich bei den poky-Mitochondrien um dieselben molekularen Spezies des Cytochrom c handelt wie sie von den Autoren bei Mycel der poky-Mutante beschrieben wurden.

Nach dem Befund von SCOTT und MITCHELL (1969) sol-

len sich Cytochrom c_I und Cytochrom c_{II} nur dadurch unterscheiden, daß das Lysin in Position 72 von Cytochrom c_{II} methyliert wird und so die 72. Aminosäure des Cytochrom c_I ε-Trimethyllysin ist. Die beiden Cytochrom c-Spezies wurden sowohl in Mycel vom Wildstamm als auch in Mycel der poky-Mutante nachgewiesen (SCOTT und MITCHELL 1969). Während des Wachstums erscheint zuerst Cytochrom c_{II} (welches bei der poky-Mutante während der logarithmischen Phase noch überwiegt), das später zum Cytochrom c_I umgewandelt wird. Der Verlust von Cytochrom c_{II} während der Mitochondrienisolierung von SCOTT und MITCHELL (1969) - vermutlich infolge der nicht hinreichend schonenden Isolierungsmethode der Autoren - bestätigt ihre Hypothese, daß die Methylierung zur Erhöhung der Bindungsaffinität zur Mitochondrienmembran führen kann.

Die physiologische Rolle von Cytochrom c_I und Cytochrom c_{II} in Mitochondrien ist unbekannt. Es könnte sich einfach um eine erhöhte Cytochrom c-Synthese handeln, wobei das zuerst synthetisierte Cytochrom c_{II} nur langsam methyliert würde.

Obwohl der hohe Cytochrom c_{II}-Gehalt bei der poky-Mutante von Neurospora zusammen mit der Cyanid-unempfindlichen Atmung vorkommt, kann die hohe Cytochrom c-Konzentration und das Vorhandensein von zwei Cytochrom c-Spezies auf die alternative Atmung bestenfalls

regulatorische Wirkung haben, weil wir keinen Hinweis haben, daß Cytochrom c Komponente der Cyanid-insensitiven Atmungskette ist. Die durch die Aktivität der Cyanid-insensitiven Atmungskette verursachten Redox-Änderungen bei Cytochrom c könnten durch den modifizierten Q-Zyklus von BONNER und RICH 1978 erklärt werden (s. Schema 2 auf S.4).

Eine Elektronenmediator-Rolle des Cytochrom c_{II} zwischen der NADH-Cytochrom b_5-Oxidoreductase der äußeren Mitochondrienmembran (PALMER 1976, MATLIB und O'BRIEN 1976, VAN DER PLAS et al. 1976, SOTTOCASA et al. 1967, DOUCE et al. 1973, NICHOLLS et al. 1969) und dem Cytochrom c bzw. der Cytochrom-Oxidase in der Innenmembran konnte mangels Antimycin-insensitiver und Cyanid-sensitiver NADH-Oxidase Aktivität nicht nachgewiesen werden.

Die einzige mitochondriale Aktivität, die parallel zu der Cytochrom c_{II}-Konzentration sowohl beim Wildstamm als auch bei der poky-Mutante von Neurospora ab- bzw. zunimmt, ist die Aktivität der äußeren NADH-Dehydrogenase der inneren Mitochondrienmembran (s. Übersichtsartikel von PALMER 1976). Die physiologische Rolle und die Regulation des Elektronentransports durch dieses Enzym ist weitgehend unbekannt. PALMER (1976) beschrieb eine mögliche Regulation durch die Kalziumkonzentration bzw. durch die Aktivität der Succinat-Dehydrogenase (PALMER 1975). Im letzteren Fall sollte die Succinat-

Dehydrogenase durch Verschieben des Redox-Gleichgewichts eines Mitglieds der Atmungskette wirken. Als Arbeitshypothese für die Untersuchung der physiologischen Rolle von Cytochrom c_I und Cytochrom c_{II} in Neurospora könnte eine Verschiebung des Redox-Gleichgewichts in der Nähe des Q-Zyklus angenommen werden, wobei sowohl die erhöhte Cytochrom c Konzentration als auch die Existenz von zwei Cytochrom c-Spezies von Bedeutung sein könnte.

D.2.4. Einführung von sterilen Kartoffelkulturen als neue Möglichkeit zur Untersuchung der Cyanid-unempfindlichen Atmung in vivo

Eine sterile Gewebekultur des Kartoffelklons HH 258 mit hoher Cyanid-unempfindlicher Atmung (50-90%) als Untersuchungs-System wurde etabliert (E.2.4.3.). Die kontinuierlich wachsende Suspensionskultur bietet neue Möglichkeiten zur Identifizierung der Faktoren, die die Synthese der alternativen Oxidase auslösen können, bzw. Möglichkeiten zur in vivo Untersuchung des Stoffwechsels von Cyanid-unempfindlichen Organismen.

Die Cyanid-unempfindliche Atmung war bei den Kulturen im normalen Kulturmedium ohne zusätzliche Induktion vorhanden. Es stellt sich die Frage, welche Faktoren die hochgradige Cyanid-Unempfindlichkeit während

der Anzucht hervorrufen. Die Cyanid-insensitive Atmung könnte (a) durch Mutation oder (b) durch direkte oder indirekte Induktion durch die Kulturbedingungen verursacht werden (unter direkter Induktion verstehe ich eine Wirkung durch Hemmung der Cytochromkette, unter indirekter Induktion andere Wirkungsmechanismen).

Cyanid-insensitive Atmung als Folge von Mutationen ist bei Mikroorganismen gut bekannt (MITCHELL und MITCHELL 1952, GRIFFITHS et al 1968, EDWARDS et al. 1973). Mutationen, sogar größere Chromosomenaberrationen infolge der langen in vitro Kultivierung müssen bei der untersuchten Gewebekultur aufgrund der Chromosomenanalyse angenommen werden (G.MELCHERS, persönliche Mitteilung). Ich halte es trotzdem für unwahrscheinlich, daß die Cyanid-Unempfindlichkeit der Kulturen infolge einer Mutation zustande kommt, denn

(a) bei Vorversuchen zeigte die genetisch intaktere Gewebekultur des K6175e Klons ähnlich hohe Cyanid-insensitive Atmung;

(b) frisch angelegte Kartoffelgewebekulturen haben während der Kallusbildung ebenfalls Cyanid-insensitive Atmung (VAN DER PLAS und WAGNER 1978).

Cyanid-insensitive Atmung kann bei Kartoffel-Knollen durch verschiedene Methoden induziert werden:

1. durch Altern von Kartoffelscheiben in feuchten Kammern oder in $CaSO_4$-Lösung (LEE und CHASSON 1966,

VAN DER PLAS et al. 1976, u.a.)

2. durch Behandlung von intakten Kartoffelknollen mit flüchtigen Substanzen wie

   (a) Hormonen (Äthylen oder Propylen - SOLOMOS und LATIES 1975, CHIN und FRENKEL 1977)

   (b) potentiellen Inhibitoren der Cytochrom-Oxidase (HCN oder CO - SOLOMOS und LATIES 1975, CHIN und FRENKEL 1977)

   (c) Endprodukten der Glykolyse wie Acetaldehyd, Äthanol und Essigsäure (FRENKEL et al. 1978). Die Induktion der Cyanid-insensitiven Atmung kann durch höhere Sauerstoff- und bei älteren Knollen auch durch höhere CO_2-Konzentrationen gesteigert werden (DAY et al. 1979, RYCHTER et al. 1978).

Die oben genannten Induktionsarten könnten mutatis mutandis auch bei der Kartoffel-Gewebekultur infrage kommen. Der Einfluß autogener flüchtiger Substanzen auf die Cyanid-unempfindliche Atmung könnte durch Veränderung der Belüftung der Kulturen relativ einfach untersucht werden.

Experimente, die Cyanid-resistente Atmung durch Veränderung der N- oder C-Quelle bzw. durch Auslassen der α-Napthylessigsäure oder Kokosmilch aus dem Kulturmedium auszuschalten bzw. deutlich herabzusetzen, führten nicht zum Erfolg (E.2.4.3.), aber die Möglichkeiten der Manipulation des Stoffwechsels durch die

chemische Zusammenstzung des Kulturmediums bzw. durch die Kulturbedingungen sind noch lange nicht ausgeschöpft. Eine Gewebekultur in definiertem Medium bietet zur Untersuchung der Induktion bzw. Depression der Cyanid-insensitiven Atmung viel bessere Möglichkeiten als Kartoffelknollen.

Ein weiterer Vorteil bei Gewebekulturen ist, daß dort der Stoffwechsel unter konstanten Bedingungen über längere Zeit erforscht werden kann. Experimente mit radioaktiv markierten Substraten wären ebenfalls möglich bei Gewebekulturen, bereiten jedoch Schwierigkeiten bei intakten Kartoffelknollen oder Gewebeschnitten wegen der Diffusionsbarriere und der hohen endogenen Kohlenhydrat-Konzentration. Die unter E.2.4.1. beschriebenen Protoplasten aus der Spadix von Arum maculatum könnten ebenfalls zu Kurzzeit-Untersuchungen des Stoffwechsels von Cyanid-unempfindlichen Organismen verwendet werden.

D.3. Wechselwirkung zwischen Dibromothymochinon und der Elektrontransportkette der Mitochondrien

D.3.1. Dibromthymochinon als Inhibitor der mitochondrialen Atmung

DBMIB hemmt die Cyanid-unempfindliche Atmung mit Citrat, Succinat oder exogenem NADH als Substrat bei Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante und bei Spadix Mitochondrien von Arum spp.. DBMIB hemmt auch den normalen, Cyanid-empfindlichen Atmungsweg in Mitochondrien des Neurospora Wild- und poky- Stammes, wenn Succinat oder Citrat als Substrat angeboten wird, es konnte jedoch in denselben Mitochondrien als Hemmstoff der Cyanid-empfindlichen Oxidation von exogenem NADH nicht verwendet werden. Bei Cyanid-sensitiven Mitochondrien aus Rhizomen von Arum cornutum erwies sich DBMIB als schwacher Inhibitor bei allen drei Substraten. Die wichtigsten Eigenschaften der DBMIB-Hemmung der mitochondrialen Atmung sind unter E.3.1.3. (S. 88) zusammengefaßt.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die DBMIB-Hemmung von der Mitochondrienkonzentration abhängig ist (E.3.2.1.) und diese Abhängigkeit wahrscheinlich darauf

beruht, daß die Konzentration des gebundenen DBMIB in der Mitochondrien bei konstanter $DBMIB_{total}$-Konzentration von den Mitochondrienkonzentration bestimmt wird (E.3.2.2.).

Das DBMIB wurde durch die Atmungskette reduziert und zeigte in intakten Mitochondrien spektroskopisch nachweisbaree Autoxidation (E.3.2.3.). Der durch DBMIB-Autoxidation verursachte Sauerstoffverbrauch lag unter den normalen Meßbedingungen im Fehlerbereich der Sauerstoffverbrauchsratebestimmung mittels Sauerstoffelektrode.

Auf Grund der beschriebenen Eigenschaften der DBMIB-Hemmung der Atmung mit verschiedenen Substraten und bei zwei Atmungswegen, könnten spezifische DBMIB-Hemmstellen in der Succinat-Dehydrogenase, in der endogenen NADH-Dehydrogenase und in der alternativen Atmungskette liegen und zusätzlich eine Wechselwirkung zwischen DBMIB und dem Q-Zyklus in der Nähe vom Cytochrom b und c stattfinden. Diese Hypothese beruht darauf, daß

a) die Cyanid-sensitive Oxidation von Succinat und Citrat durch DBMIB gehemmt wurde, die Oxidation von exogenem NADH in Neurospora-Mitochondrien jedoch nicht;

b) die Oxidation von exogenem NADH über den Cyanid-unempfindlichen Atmungsweg durch DBMIB gehemmt werden konnte;

c) die I_{50}-Werte für die endogene NADH-Oxidase niedriger liegen als die für die Succinat-Oxidase;
d) DBMIB wahrscheinlich hauptsächlich in der Nähe des Q-Zyklus reduziert wurde (E.3.2.4.).

DBMIB als Hemmstoff der CN^--insensitiven Atmung der Neurospora-Mitochondrien wurde von LUKACS und NINNEMANN (1977) und DRABIKOWSKA (1977) eingeführt. SIEDOW et al. (1978, 1979) berichteten über eine DBMIB-Hemmung der Cyanid-unempfindlichen Atmung auch in Mitochondrien von Phaseolus aureus. Die Einführung eines neuen Inhibitors erschien wegen der begrenzten Spezifizität der Hydroxamsäure-Derivate als Inhibitoren notwendig (SOLOMOS 1977, RICH et al. 1978, RICH 1978). Experimentelle Befunde deuteten außerdem darauf hin, daß die alternative Atmungskette nach dem Ubichinon mindestens noch aus zwei Komponenten besteht (STOREY 1976, SOLOMOS 1977). Auf Grund der in dieser Arbeit bewiesenen vielseitigen Wechselwirkung zwischen DBMIB (als Inhibitor, Elektronenakzeptor und Elektronenmediator) und den Mitochondrien kann DBMIB als einfacher Inhibitor der Cyanid-unempfindlichen Atmung anstelle von Hydroxamsäure-Derivaten nicht empfohlen werden, könnte jedoch für die Auflärung des Elektrontransports auf molekularer Ebene in intakten Mitochondrien verwendet werden.

Bei der teilweise gereinigten Cyanid-resistenten

Ubichinol-Oxidase von Arum konnte keine DBMIB-Hemmung der Sauerstoffverbrauchsraten nachgewiesen werden (RICH 1978). Der scheinbare Widerspruch ist dadurch zu erklären, daß DBMIB in Membranpartikeln mit viel größerer Geschwindigkeit autoxidiert als in intakten Mitochondrien (E.3.2.3.2.). Der Sauerstoffverbrauch der Membranpartikel setzt sich aus dem Sauerstoffverbrauch der DBMIB-Autoxidation und dem der mitochondrialen Elektrontransportkette zusammen, wobei die Rate der DBMIB-Autoxidation (und Reduktion) von der Zeit, von der Anwesenheit von anderen Inhibitoren und von anderen Versuchsbedingungen abhängig sein kann (MELANDRI et al. 1974, POOLE und HADDOCK 1975, SURKOV und KONSTANTINOV 1980, dieser Arbeit E.3.2.3.).

Die DBMIB-Hemmung der CN^--sensitiven Atmung mit Succinat oder Citrat als Substrat in Mitochondrien des Neurospora Wild- und poky- Stammes stimmt qualitativ mit den Ergebnissen von anderen Autoren überein (LOSCHEN und AZZI 1974, MELANDRI et al. 1974, DRABIKOWSKA 1977, SIEDOW et al. 1978, 1979).

Ein wesentliches Argument zur Unterstützung der vorgelegten Hypothese über die DBMIB-Hemmung der mitochondrialen Atmung war die Nicht-Hemmung der CN^--sensitiven exogenen NADH-Oxidase-Aktivität in Neurospora-Mitochondrien. Der Befund konnte auf Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum nicht erweitert werden, weil

DBMIB, vermutlich wegen der hohen Mitochondrienkonzentration, auch die Atmung mit Succinat oder Citrat nur schlecht hemmte. HUQ berichtete aber über die DBMIB-Hemmung der CN^--sensitiven Atmung mit exogenem NADH als Substrat in Spadix-Mitochondrien von Arum maculatum (HUQ und PALMER 1978c). Es wäre jedoch durchaus möglich, daß DBMIB bei der Hemmung der Oxidation von exogenem NADH bei Mitochondrien von verschiedenen Organismen ein unterschiedliches Verhalten zeigen kann. Mehrere Mitteilungen in der Literatur deuten darauf hin, daß die Cyanid-empfindlichen und Cyanid-unempfindlichen Atmungswege für die Elektronen von der äußeren NADH-Dehydrogenase, abhängig von Organismus bzw. Entwicklungsstadium, unterschiedlich zugänglich sein können (TOMLINSON und MORELAND 1975, DIZENGREMEL 1975, VAN DER PLAS und VERLEUR 1976, DOUCE et al. 1977, HUQ und PALMER 1977).

Der Bericht von DRABIKOWSKA (1977) über die DBMIB-Hemmung der CN^--sensitiven exogenen NADH-Oxidase in Neurospora-Mitochondrien stimmt mit meinen Befunden und meiner Interpretation der DBMIB-Hemmwirkung nicht überein. Diese Diskrepanz kann ich nicht erklären. Es gibt jedoch zwei Indizien, die vermuten lassen, daß die Versuchsbedingungen von DRABIKOWSKA (1977) mit denen der vorliegenden Arbeit nicht vergleichbar waren. Erstens lagen die I_{50}-Werte sowohl für die Succinat-Oxidase als auch für die exogene NADH-Oxidase Aktivität bei 170

µM (das ist etwa eine Größenordnung höher als meine oder die sonstigen Literatur-Werte), und somit in einem DBMIB-Konzentrationsbereich, wo ich unspezifische Wirkungen des DBMIB erwarten würde. Zweitens war unter meinen Anzuchtsbedingungen die Succinat-Oxidase-Aktivität der Mitochondrien von 16-20 Stunden altem Mycel zweimal höher als die der exogenen NADH-Oxidase (s. Tabelle 1, S. 38),die bei DRABIKOWSKA (1977) verwendeten Mitochondrienkonzentrationen lassen dagegen ein gerade umgekehrtes Verhältnis vermuten.

Die Abhängigkeit der DBMIB-Hemmung von der Mitochondrienkonzentration bei Neurospora- und Arum-Mitochondrien (E.3.2.1.) steht in Widerspruch zum Befund von SIEDOW et al. (1978, 1979), daß die Änderung der Mitochondriennzentration zwischen 0,2 und 0,8 mg Protein/ml keinen Einfluß auf die DBMIB-Hemmung der Atmung der Mitochondrien von Phaseolus aureus hatte. Weil die o.g. Abhängigkeit an verschiedenen Stellen der Hemmungskurve stark oder weniger deutlich zum Ausdruck kommen kann, halte ich es für möglich, daß die Autoren bei ungünstiger Inhibitorkonzentrationen gearbeitet haben und die Streuung ihrer Messungen die doch vorhandene Mitochondrienkonzentrationsabhängigkeit verdeckte.

In der vorgelegten Hypothese wird eine DBMIB-Hemmung an spezifischen Hemmstellen, d.h. an definierten

Enzymen der Atmungskette, vorgeschlagen. Wegen der vielseitigen Wechselwirkungen zwischen DBMIB und Mitochondrien könnte DBMIB den mitochondrialen Elektronentransport auch durch unspezifische Veränderung der Mitochondrienmembran hemmen (SIEDOW et al. 1978, 1979) oder als Elektronenakzeptor den Sauerstoffverbrauch durch die beiden Atmungswege herabsetzen.

Im Falle einer Kompetition zwischen DBMIB und der Atmungsketten für die Elektronen könnte erwartet werden, daß die "DBMIB-Hemmung" mit der Zeit abnimmt, weil die DBMIB-Reduktion ihr Gleichgewicht erreicht. Eine mit der Zeit abnehmende DBMIB-Hemmung wurde in einigen Fällen tatsächlich beobachtet (SURKOV und KONSTANTINOV 1980, eigene Beobachtung bei Neurospora-Mitochondrien, wenn DBMIB zu mit Succinat vorinkubierten Mitochondrien zugegeben wurde), traf jedoch bei der unter E.3.1. beschriebenen Experimenten nicht zu.

Durch den von SIEDOW et al. (1978, 1979) vorgeschlagenen DBMIB-Wirkungsmechanismus, d.h. ausschließlich durch eine unspezifische Herabsetzung der Fluidität der Mitochondienmembran, kann die DBMIB-Hemmung meines Erachtens nicht hinreichend erklärt werden. So erklärt das obige Modell nicht, warum die Vorinkubation mit DBMIB für die optimale DBMIB-Hemmung notwendig ist (im Falle nachträglicher DBMIB-Zugabe zu Substrat reduzierten Mitochondrien liegen die I_{50}-Werte viel höher, als wenn die Mitochondrien mit DBMIB vor-

inkubiert sind (MELANDRI et al. 1974, auch eigene Beobachtung), in der DBMIB-Bindung konnten jedoch keine wesentlichen Unterschiede bei den genannten Bedingungen festgestellt werden (E.3.2.3.)). Die Frage, wann und welche Membranveränderungen zwangsläufig zur Hemmung des Elektronentransports führen, konnte bisher nicht beantwortet werden. Durch die DBMIB-verursachten Membranveränderungen wurde die Phosphorylierung mit exogenem NADH als Substrat in Neurospora Wild-Mitochondrien bei solchen DBMIB-Konzentrationen noch nicht betroffen, wo die Succinat- bzw. Citrat-Oxidase-Aktivität bereits 70 - 90% gehemmt wurde (s. Abb. 34 S. 125). SIEDOW et al. (1978, 1979) sind zudem bei der Interpretation ihrer Ergebnisse von den unrichtigen Annahmen ausgegangen, daß DBMIB in den Mitochondrien nicht reduziert wird (vgl. aber E.3.2.3.) und die Hemmung von der Mitochondrienkonzentration unabhängig sei (vgl. aber E.3.2.1.).

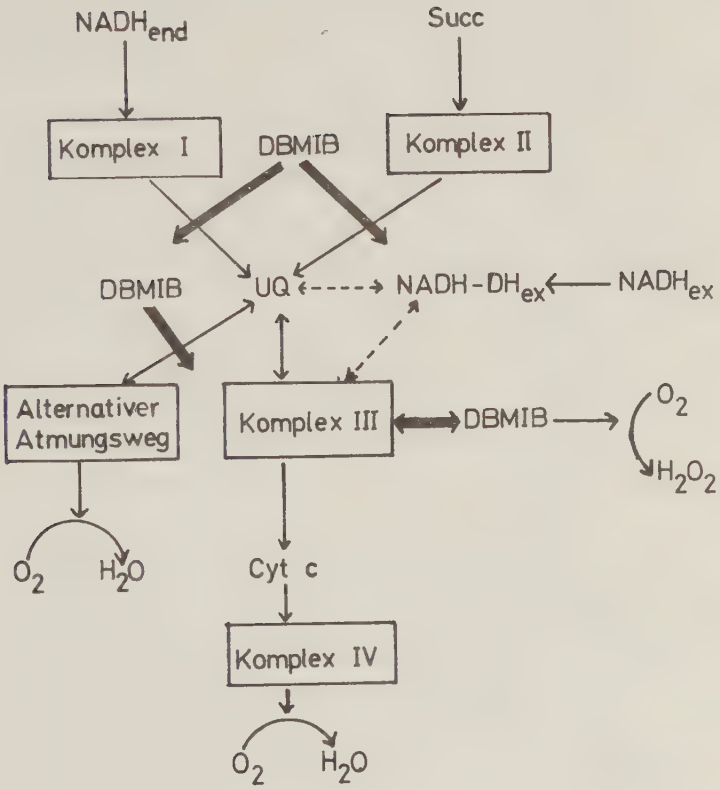
Die wahrscheinlichsten Kandidaten für eine stellenspezifische DBMIB-Hemmung wären die verschiedenen Ubichinon-bindenden Enzyme der Atmungskette (YU et al. 1977a und b, 1978). Die Existenz eines Ubichinon-Proteins auch in dem Cyanid-unempfindlichen Atmungsweg wurde vorgeschlagen (BONNER und RICH 1978).

Ob das zusätzlich zur Phasenverteilung in Mitochondrien gebundene DBMIB an solchen spezifischen Stellen gebunden wurde, konnte nicht untersucht werden.

Zur Klärung diese Frage sollten Bindungsexperimente bei niedrigem DBMIB zu Mitochondrien-Konzentrationsverhältnis mit radioaktiv markiertem DBMIB durchgeführt werden.

Ein experimentelles Indiz deutet darauf hin, daß DBMIB in Mitochondrien vermutlich in der reduzierten Form hemmt, wie es für Chloroplasten beschrieben wurde (OETTMEIER et al. 1978, REIMER et al. 1979). In Anwesenheit von Succinat als Substrat wurde in Neurospora-Mitochondrien nach Erreichen eines maximalen Reduktionsgrad des DBMIB die Autoxidation des Hemmstoffs beobachtet, was durch eine Hemmung des Elektrontransports durch reduziertes DBMIB erklärt werden könnte (s. D.3.2.).

Zusammenfassend könnte das im Schema 3 dargestellte Modell für die DBMIB-Hemmung der Atmung in Neurospora-Mitochondrien vorgeschlagen werden. Es soll dabei betont werden, daß UQ in Schema 3 nicht einen homogenen Ubichinon-Pool darstellt, sondern mehrere, miteinander im Gleichgewicht stehende Ubichinon-Proteine, d.h. miteinander kommunizierende, jedoch getrennte "Q-Pools" symbolisiert.



Schema 3 DBMIB-Hemmung und -Reduktion in Neurospora-Mitochondrien.
Die Fettdruck-Pfeile zeigen die Stellen, wo DBMIB mit der mitochondrialen Atmungskette in Wechselwirkung tritt.

D.3.2. DBMIB als autoxidabler Elektronenakzeptor

DBMIB-Reduktion und Autoxidation wurde in intakten Neurospora-Mitochondrien durch direktes spektroskopisches Verfolgen des Redoxzustandes des DBMIB nachgewiesen (E.3.2.3.). Der Sauerstoffverbrauch der DBMIB-Autoxidation war in Mitochondrien in Gegensatz zu submitochondrialen Partikeln (MELANDRI et al. 1974, SURKOV und KONSTANTINOV 1980) niedrig. Die niedrige, mittels Sauerstoffelektrode unter normalen Bedingungen nicht messbare Sauerstoffverbrauchsrate der DBMIB-Autoxidation führte bei einigen Autoren zu der falschen Annahme, daß DBMIB in Mitochondrien nicht reduziert würde (LOSCHEN und AZZI 1974, SIEDOW et al. 1978, 1979).

Eine schnelle und einfache Methode zum Nachweis der DBMIB-Reduktion in Mitochondrien mit der Sauerstoffelektrode wurde eingeführt (E.3.2.3.2.): die Verschiebung des pH der Mitochondriensuspension nach erfolgter DBMIB-Reduktion von pH = 7,2 zu pH = 8,5-9,0 löste rasche und gut messbare DBMIB-Autoxidation aus. Das basische pH wirkt wahrscheinlich durch Beschleunigung der DBMIB-Autoxidation selbst (MELANDRI et al. 1974), könnte aber zusätzlich auch das reduzierte DBMIB in Mitochondrienmembranen für Sauerstoff besser zugänglich machen (vgl. E.2.2.).

Die DBMIB-Reduktion zeigte eine Abhängigkeit vom Elektronentransport bzw. vom Redox-Zustand von Komponenten der Atmungskette (E.3.2.3.1.). Umgekehrt konnte in Anwesenheit von Inhibitoren der Atmungskette (KCN und Antimycin) durch DBMIB-Zugabe die Oxidation von b-Typ Cytochromen und die Reduktion von Cytochrom c hervorgerufen werden (E.3.2.4.). Die DBMIB-verursachten Redox-Änderungen der Cytochrome können, in Übereinstimmung mit POOLE und HADDOCK (1975), SURKOV und KONSTANTINOV (1980) und in Gegensatz zu LOSCHEN und AZZI (1974), durch eine Elektronenakzeptor- und Elektronenmediator-Rolle des DBMIB erklärt werden. Diese Erklärung ist nicht ausreichend für die Interpretation der DBMIB-Reduktion selbst. Die Eigenschaften der DBMIB-Reduktion können unter der Annahme erklärt werden, daß DBMIB sowohl als Elektronenakzeptor als auch als Inhibitor seiner eigenen Reduktion fungiert. Für diese Annahme spricht der Bericht von OETTMEIER et al. (1978), worin ein ähnlicher Mechanismus für die DBMIB-Wirkung in Chloroplasten vorgeschlagen wurde. Die Befunde von MELANDRI et al. (1974) und DRABIKOWSKA (1977) und die Eigenschaften der DBMIB-Hemmung der mitochondrialen Atmung (s. E.3.1. und die Literaturangaben dort) unterstützen ebenfalls die obige Annahme.

Die DBMIB-Reduktion in Neurospora-Mitochondrien konnte in Anwesenheit von Succinat oder Citrat als Sub-

strat spektroskopisch nachgewiesen werden. Das direkte spektroskopische Verfolgen der DBMIB-Reduktion in Anwesenheit von exogenem NADH war wegen der hochen UV-Absoption des Substrates nicht möglich. Einige Indizien deuten darauf hin, daß DBMIB auch durch exogenes NADH als mitochondriales Substrat reduziert werden könnte:

1. nach pH-Schock wurden die höchsten DBMIB-Autoxidationsraten in Anwesenheit von exogenem NADH als Substrat (mit und ohne KCN) gemessen (Abb. 37);
2. Antimycin hemmt sowohl die DBMIB-Reduktion in Anwesenheit von Succinat (Abb. 33) als auch die Atmung mit exogenem NADH als Substrat;
3. in poky-Mitochondrien wurde in Anwesenheit von exogenem NADH und SHAM (einem Inhibitor der alternativ Oxidase) durch DBMIB-Zugabe hochgradige Cytochrom c-Reduktion ausgelöst (Abb. 44);
4. DRABIKOWSKA 1977 beschrieb die Stimulierung der exogenen NADH-Ferricyanid Oxidoreduktase-Aktivität durch DBMIB (20-200 μM), was eine direkt Wechselwirkung zwischen der äußeren NADH-Dehydrogenase und DBMIB vermuten lässt.

Die DBMIB-Reduktion in Anwesenheit nur von Succinat konnte bei niedriger $DBMIB_{total}$-Konzentration durch Erhöhung der $DBMIB_{total}$-Konzentration gesteigert werden, erreichte jedoch bald einen Grenzwert (30-40 nmol $DBMIB_{red}$/mg mitochondriales Protein) und nahm mit zu-

nehmender $DBMIB_{total}$-Konzentrationen nicht weiter zu. Bei konstanter $DBMIB_{total}$-Konzentration wurde nach Erreichen des maximalen Reduktionsgrades des DBMIB eine langsame Autoxidation beobachtet.

Die Anwesenheit von KCN erhöhte die Geschwindigkeit und das Ausmaß der DBMIB-Reduktion und dieser Effekt war bei höheren $DBMIB_{total}$-Konzentrationen (> 30nmol $DBMIB_{gebunden}$/mg mitochondriales Protein) ausgeprägter. Antimycin dagegen verlangsamte die DBMIB-Reduktion (mit und ohne KCN) und minderte in Abwesenheit von KCN auch die maximal reduzierbare DBMIB-Menge.

Die beschriebenen Charakteristika der DBMIB-Reduktion könnten durch folgende Hypothese erklärt werden. DBMIB wird überwiegend beim Q-Zyklus (MITCHELL 1976) reduziert, wobei die DBMIB-Reduktion direkt oder indirekt durch den Redox-Zustand des Cytochrom c kontrolliert wird. Mit zunehmender DBMIB-Hemmung des Elektronentransports wird die die DBMIB-Reduktion kontrollierende Komponente (= Cytochrom c?) zunehmend oxidiert und hindert den Elektronenfluß zum DBMIB. Die Hemmung der Cytochrom-Oxidase durch KCN führt zur Reduktion des Cytochrom c und folglich zur weiteren DBMIB-Reduktion. Antimycin dagegen hemmt den normalen Ablauf des Q-Zyklus (MITCHELL 1976) und kann dadurch einerseits zur Cytochrom c-Oxidation führen und anderseits die Entstehung des notwendigen Redoxzustandes des präferentiellen

Elektronendonors für DBMIB inhibieren.

Literaturdaten deuten darauf hin, daß DBMIB an mehreren Stellen der Atmungskette als Elektronenakzeptor fungieren kann. So wurde DBMIB-Reduktion durch die endogene NADH-Dehydrogenase vor der Rotenon-Hemmstelle (MELANDRI et al. 1974 und SURKOV und KONSTANTINOV 1980) und am Succinat-Dehydogenase-Komplex (MELANDRI et al. 1974, aber vgl. SURKOV und KONSTANTINOV 1980) beschrieben, und eine DBMIB-Reduktion in dem (oder zumindest eine Beeinflußung der DBMIB-Reduktion durch den) alternativen Atmungsweg ist ebenfalls wahrscheinlich (s.E.3.2.4.1.2.). Die Reduktion des DBMIB bei Ubichinon/Cytochrom b wurde von mehreren Autoren beschrieben (POOLE und HADDOCK 1975 und SURKOV und KONSTANTINOV 1980). Auf Grund der unter E.3.2.3.1. berichteten Ergebnissen sollte dieser Stelle für den größten Anteil der DBMIB-Reduktion aufkommen, was jedoch geringfügigere DBMIB-Reduktion an anderen Stellen der Atmungskette nicht ausschließt.

Der Einfluß des DBMIB auf den Redoxzustand der Komponenten der Atmungskette wurde unter E.3.2.4. beschrieben. Die DBMIB-verursachte reversible Cytochrom b-Oxidation in Anwesenheit von KCN oder KCN und Antimycin erweitert den Befund anderen Autoren (LOSCHEN und AZZI 1974, POOLE und HADDOCK 1975, SURKOV und KONSTANTINOV

1980) auch für Neurospora-Mitochondrien. In Gegenwart von KCN und Antimycin wurde zusätzlich eine reversible Cytochrom c-Reduktion beobachtet. Die obige Änderung der Spektren im sichtbaren Spektralbereich konnte in Anwesenheit von exogenem NADH als Substrat nicht nachgewiesen werden, was jedoch einen sehr rasch abklingenden DBMIB-Effekt nicht ausschließt. Zur Klärung der Frage, ob DBMIB in Anwesenheit von exogenem NADH den gleichen Effekt hat wie in Anwesenheit von Succinat oder Citrat wäre ein schnelles zeitkinetisches Verfolgen des Redoxzustandes von Cytochrom b und c notwendig.

Das Verfolgen der Redox-Änderungen von DBMIB, Cytochrom b-560 und Cytochrom c in Anwesenheit von Succinat mit der Zeit zeigte, daß die Oxidation des Cytochrom b-560 und die Reduktion des Cytochrom c (in Anwesenheit von KCN und Antimycin) sofort nach DBMIB-Zugabe stattfindet. Die DBMIB-Reduktion und die Rückreduktion des Cytochrom b-560 schienen voneinander abhängig zu sein und zeigten eine zeitliche Parallelität; die Rückoxidation des Cytochrom c erfolgte später. Die Anwesenheit von Antimycin führte nicht nur zur langsameren DBMIB-Reduktion, sondern veränderte auch die Kinetik der Rückreduktion des Cytochrom b dahingehend, daß die lag-Phase der Rückreduktion verschwand und die Reduktion einer einfachen Kinetik folgte.

Diese Verhalten könnte auf Grund des Q-Zyklus

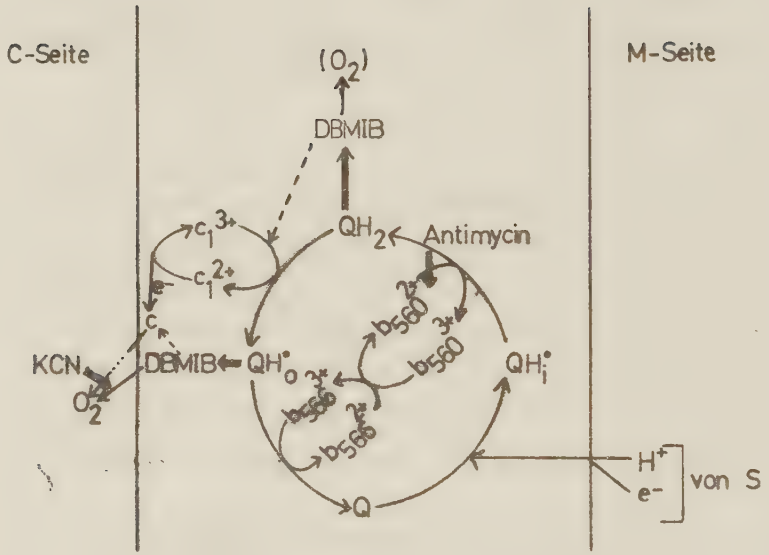
(MITCHELL 1976) so erklärt werden, daß DBMIB beim Q-Zyklus, wahrscheinlich bei QH_2 und/oder bei dem äußeren Ubichinonzentrum $QH_o^{\bullet}$ (SURKOV und KONSTANTINOV 1980), reduziert würde, und als Elektronenakzeptor zur Oxidation der b-Typ Cytochrome führte. In Anwesenheit nur von KCN und Substrat wäre der Ablauf des Q-Zyklus und der DBMIB-Reduktion ungehindert und der Entzug der Elektronen von Cytochrom b so stark, daß die Rückreduktion des Cytochrom b-560 erst nach fortgeschrittener DBMIB-Reduktion erfolgen könnte. Antimycin würde den normalen Verlauf des Zyklus, den Entzug der Elektronen von Cytochrom b-560 und dadurch auch die DBMIB-Reduktion hemmen und so das Erreichen des steady-states verlangsamen, jedoch von Anfang an zur Cytochrom b-560-Reduktion führen. Für die Cytochrom c-Reduktion nach DBMIB-Zugabe in Antimycin- und KCN-gehemmten Neurospora-Mitochondrien könnte die Kopplung des Redoxzustandes von Cytochrom b und c durch den Q-Zyklus (MITCHELL 1976, RIESKE 1976) und /oder reduziertes DBMIB als Elektronendonor für Cytochrom c (RICH und BENDALL 1980) verantwortlich sein.

Eine Erhöhung der Cytochrom b-Oxidation nach DBMIB-Zugabe durch Anwesenheit von Antimycin (SURKOV und KONSTANTINOV 1980) wurde in Neurospora-Mitochondrien nur insofern beobachtet, als Antimycin zur Reduktion des Cytochrom b-566 führte, welches nach DBMIB-Zugabe genau wie auch Cytochrom b-560 reversibel oxidiert wurde. Bei

SURKOV und KONSTANTINOV (1980) ist es nicht ersichtlich, ob bei der Bestimmung des Reduktionsgrades von Cytochrom b der Zeitfaktor, d.h. die in Anwesenheit von Antimycin stark herabgesetzte Reduktionsgeschwindigkeit des DBMIB und folglich die langsamere Rückreduktion der b-Typ Cytochrome in Betracht bezogen wurde.

Vorbereitende Experimente deuten auch auf mögliche DBMIB-verursachte Absorptionszunahme bei 450-500 nm (Flavopoteinoxidation?) hin. Außerdem wurde in Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante nach Hemmung des alternativen Atmungsweges mit SHAM durch DBMIB-Zugabe Cytochrom c-Reduktion auch in Abwesenheit von KCN und Antimycin hervorgerufen. Diese Ergebnisse sind vorbereitend und bedürfen weiterer experimenteller Klärung.

Die DBMIB-Reduktion am Q-Zyklus (MITCHELL 1976) könnte zusammenfassend in einem vorläufigen Schema modifiziert nach SURKOV und KONSTANTINOV 1980 dargestellt werden (Schema 4). Eine genauere Charakterisierung oder die Einbeziehung von anderen möglichen Faktoren (wie z.B. pH) war nicht möglich, weil grundlegende Mechanismen und die Regulation des Q-Zyklus bisher ungeklärt sind. Gerade zur Klärung solcher Fragen könnten 1,4-Benzochinonderivate wie DBMIB mit beitragen.



Schema 4 DBMIB-Reduktion am Q-Zyklus in Neurospora-Mitochondrien modifiziert nach dem Schema von SURKOV und KONSTANTINOV (1980).
Der hypothetische Protonentransport und die Gleichgewichtsverhältnisse der Reaktionspartner sind im Schema nicht gezeigt. $QH^{\bullet}_o$ und $QH^{\bullet}_i$ symbolisieren die hypothetischen äußeren und inneren Ubisemichinon-Zentren (MITCHELL 1976), b-566, b-562, c_1 und c die entsprechenden Cytochrome, AA = Antimycin.

D.3.3. Bedeutung und Möglichkeiten der Verwendung des DBMIB in weiterführenden Experimenten

Die Bedeutung des DBMIB bei Untersuchungen der Atmungsketten der pflanzlichen Mitochondrien besteht darin, daß DBMIB sowohl die Cyanid-unempfindliche Atmung hemmen als auch den Redoxzustand der Komponenten der normalen, CN^--sensitiven Atmungskette an und nach der Verzweigungspunkt der beiden Atmungswege beeinflussen kann. Weitere Untersuchung des Elektronentransports in der Nähe des Ubichinons bzw. der Wechselwirkung der CN^--insensitiven und CN^--sensitiven Atmungswege durch Verwendung von DBMIB und anderen 1,4-Benzochinonderivaten könnte zum besseren Verständnis der Regulation des Elektronenflusses zwischen den beiden Atmungswegen führen. Wenn der Befund, daß DBMIB die CN^--insensitive Oxidation des exogenem NADH hemmt, die CN^--sensitive Oxidation jedoch nicht, außer bei Neurospora-Mitochondrien auch bei anderen Organismen bestätigt werden könnte, wäre DBMIB auch für die genauere Charakterisierung der Stelle geeignet, wo die Elektronen von der äußeren NADH-Dehydrogenase in die Atmungskette einmünden.

Die Durchführung der folgenden Experimente wird vorgeschlagen:

1. Untersuchung der DBMIB-Hemmung der CN^--sensitiven

und CN^--insensitiven exogenen NADH-Oxidase Aktivität in Kartoffelmitochondrien aus der Gewebekultur des HH 258 Kartoffelklons.

2. Schnelle zeitkinetische Untersuchung der Redoxänderungen von Cytochrom b und c nach DBMIB-Zugabe in Anwesenheit von exogenem NADH und Inhibitoren der Atmungskette (KCN, Antimycin und SHAM).

3. Untersuchung der DBMIB-Hemmung des alternativen Atmungswegs, wenn DBMIB nach Substrat zugegeben wird bei verschiedenen Substrat- und Inhibitor-Kombinationen (Kurz- und Langzeit-Kinetiken).

4. Unter identischen Bedingungen (wie bei 3.) sollten die Redoxänderungen von DBMIB, Cytochrom b und c verfolgt werden.

5. Verfolgen der Redoxänderungen von Cytochrom b und Cytochrom c nach DBMIB-Zugabe in Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante in Anwesenheit von verschiedenen Substraten und SHAM bzw. SHAM plus Antimycin.

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Teil dieser Arbeit bestand in methodischen Untersuchungen, die die Erforschung der physiologischen Rolle der Cyanid-unempfindlichen Atmung erleichtern sollten.

Eine sterile Suspensionskultur des Kartoffelklons HH 258 mit hoher CN^--insensitiver Atmung (50-90%) wurde als Untersuchungs-System etabliert. Das Wachstum der Kultur und die Atmung der Zellen und Mitochondrien während des Wachstums wurden charakterisiert.

Qualitative und quantitative Änderungen der mitochondrialen Aktivitäten während des Wachstums des Organismus wurden in Mitochondrien des Neurospora Wild- und poky-Stammes systematisch untersucht und nachgewiesen.

Die Induktion der Cyanid-unempfindlichen Atmung durch Belichtung des Mycels des Wildstammes von Neurospora wurde gezeigt.

Der andere Teil dieser Arbeit bestand in Untersuchung der Wechselwirkung des Dibromothymochinons (DBMIB) mit der Atmungskette der Mitochondrien.

DBMIB hemmte die mitochondriale Atmung
- durch den CN^--insensitiven Atmungsweg mit Succinat, Citrat oder exogenem NADH als Substrat in Mitochondrien der Neurospora poky-Mutante und in Spadix-Mitochondrien von Arum;
- durch den normalen, CN^--sensitiven Atmungsweg mit Succinat oder Citrat als Substrat in Mitochondrien des Neurospora Wild- und poky-Stammes.

DBMIB hemmte nicht die CN^--sensitive Oxidation des exogenen NADH in Mitochondrien der Neurospora.

Die DBMIB-Hemmung war schwach bei den CN^--sensitiven Rhizom-Mitochondrien von Arum cornutum mit allen o.g. Substraten.

Die Hemmung der Atmung war von der Mitochondrienkonzentration abhängig.

Eine Abhängigkeit der DBMIB-Bindung von dem $DBMIB_{total}$-zu Mitochondrien-Konzentrationsverhältnis wurde nachgewiesen.

Die Assozierung des DBMIB mit den Mitochondrien kam sowohl durch Phasenverteilung als auch durch zusätz-

liche DBMIB-Bindung zustande, wobei das wegen der Phasenverteilung gebundene DBMIB meist stark überwog.

Eine Hypothese zur Wirkung des DBMIB als spezifischer Inhibitor der Atmung der Neurospora-Mitochondrien wurde aufgestellt.

DBMIB-Reduktion und langsame Autoxidation wurde in Neurospora-Mitochondrien spektroskopisch nachgewiesen.

Eine schnelle Methode zum qualitativen Nachweis der DBMIB-Reduktion in Mitochondrien mit der Sauerstoffelektrode wurde eingeführt (pH-Schock).

In Anwesenheit von Succinat wurde maximal 30-40 nmol DBMIB/mg mitochondriales Protein reduziert; KCN erhöhte, Antimycin hemmte die DBMIB-Reduktion.

Die Charakteristika der DBMIB-Reduktion wurden durch die Rolle des DBMIB als Elektronenakzeptor und zugleich Inhibitor der eigenen Reduktion erklärt.

Es wurde nachgewiesen, daß DBMIB in KCN-(+Antimycin-) gehemmten Neurospora-Mitochondrien auch die reversible Oxidation der b-Typ Cytochrome hervorruft. In Anwesenheit von KCN und Antimycin wurde außer Cytochrom b-Oxidation auch Cytochrom c-Reduktion beobachtet.

Eine Zusammenhang zwischen DBMIB-Reduktion und der Rückreduktion der b-Typ Cytochrome wurde gezeigt, und die Antimycin Wirkung auf die Reduktion untersucht. Die DBMIB-Wirkung auf den Redox-Zustand des Cytochrom b und c wurde durch die Elektronakzeptor-Rolle des DBMIB beim Q-Zyklus erklärt.

Weiterführende Experimente zur Untersuchung der Funktion des Ubichinons am Verzweigungspunkt der CN^--sensitiven und CN^--insensitiven Atmungsketten durch Verwendung des DBMIB wurden vorgeschlagen.

LITERATURVERZEICHNIS

BAHR, J.T. and W.D. BONNER, Jr.: Cyanide-insensitive respiration. I. The steady states of skunk cabbage spadix and mung bean hypocotyl mitochondria.
J. Biol. Chem. 248, 3441-3445 (1973a).

BAHR, J.T. and W.D. BONNER, Jr.: Cyanide-insensitive respiration. II. Control of the alternate pathway.
J.Biol. Chem. 248, 3446-3450 (1973b).

BEHNKE, M.: Regeneration in Gewebekulturen einiger dihaploider Solanum tuberosum-Klone.
Z. Pflanzenzüchtg. 75, 262-265 (1975).

BENDALL, D.S. and W.D. BONNER, Jr.: Cyanide-insensitive respiration in plant mitochondria.
Plant Physiol. 47, 236-245 (1971).

BONNER, W.D., Jr. and P.R. RICH: The nature and location of cyanide and antimycin resistant respiration in higher plants.
Abstracts 11th FEBS Meeting, Copenhagen, B6-1, L1 (1977).

BONNER, W.D., Jr. and P.R. RICH: Molecular aspects of cyanide/antimycin resistant respiration.
In: G.DUCET and C.LANCE (eds.), Plant Mitochondria, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp.241-247 (1978).

CAMMACK, R. and J.M. PALMER: Iron-sulphur centres in mitochondria from Arum maculatum spadix with very high rates of cyanide-resistant respiration.
Biochem. J. 166, 347-355 (1977)

CHANCE, B. and G.R. WILLIAMS: The respiratory chain and oxidative phosphorylation.
Advan. Enzymol. 17, 65-134 (1956).

CHAVEAU, M.:Variabilité de la resistance à l'action inhibitrice du cyanure dans les mitochondries d'Arum.
Physiol. Veg. 284, 1281-1284 (1977).

CHIN, C-K. and C. FRENKEL: Upsurge in respiration and peroxide formation in potato tubers as influenced by ethylene, propylene and cyanide.
Plant Physiol. 59, 515-518 (1977).

CRANE, F.L., J.L. GLENN and D.E. GREEN: Studies on the electron transfer system. IV. The electron transfer particle.
Biochim. Biophys. Acta 22, 475-487 (1956).

COLVIN, H.J., B.L. SAUER and K.D. MUNKRES: Respiration of wild-type and extrachromosomal mutants of Neurospora crassa.
J. Bacteriol. 116, 1314-1321 (1973).

DAY, D.A., G.P. ARRON, R.E. CHRISTOFFERSEN and G.G. LATIES: Effect of ethylene and carbon dioxide on potato metabolism. Stimulation of tuber and mitochondrial respiration, and inducement of the alternative path.
Plant Physiol. 62, 820-825 (1978).

DIZENGREMEL, P: La voie d'oxydation insensible au cyanure dans les mitochondries de tranches de Pomme de terre (Solanum tuberosum L.). Maintenues en survie.
Physiol. Veg. 13(1), 39-54 (1975).

DIZENGREMEL, P. and C. LANCE: Control of changes in mitochondrial activities during ageing of potato slices.
Plant Physiol. 58, 147-151 (1976).

DOUCE, R., C.A. MANNELLA and W.D. BONNER, Jr.: The external NADH dehydrogenases of intact plant mitochondria.
Biochim. Biophys. Acta 292, 105-116 (1973).

DRABIKOWSKA, A.K.: Dibromothymoquinone inhibition of the cyanide-sensitive and -insensitive respiration in mi - 1 mutant of Neurospora.
Life Sci. 21, 667-674 (1977).

EDWARDS, D.L., F. KWIECINSKI and J. HORSTMAN: Selection of respiratory mutants of Neurospora crassa.
J. Bacteriol. 114, 164-168 (1973).

EDWARDS, D.L., and E. ROSENBERG: Regulation of cyanide-insensitive respiration in Neurospora.
Eur. J. Biochem. 62, 217-221 (1976).

EDWARDS, D.L., E. ROSENBERG and P.A. MARONEY: Induction of cyanide-insensitive respiration in Neurospora crassa.
J. Biol. Chem. 249, 3551-3556 (1974).

EDWARDS, D.L., and B.W. UNGER: Induction of hydroxamate-sensitive respiration in Neurospora mitochondria.
FEBS Lett. 85, 40-42 (1978).

EYJOLFSSON, R.: Recent advances in the chemistry of cyanogenic glycosides.
Fortschr. Chem. Org. Naturst. 28, 74-108 (1970).

EVANS, E.H. and D.A. GOODING: The effect of dibromo-thymoquinone on respiratory and photosynthetic electron transport in Rhodopseudomonas capsulata chromatophores.
Arch. Microbiol. 111, 171-174 (1976).

FRENKEL, Ch., H.W. JANES and A. RYCHTER: Factors influencing the development of cyanide resistant respiration in mitochondria from whole potato tissue.
In: G. DUCET and C. LANCE (eds.), Plant Mitochondria, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 315-322 (1978).

GAUTHERET, R.J.: Manuel technique de culture des tissus vegetaux.
Gallimard, Paris (1942).

GORNALL, A.G., C.J. BARDAWILL and M.M.DAVID:
Determination of serum proteins by means of the biuret reaction.
J. Biol. Chem. 177, 751-766 (1949).

GREENAWALT, J.W., D.O. HALL and O.C. WALLIS: Preparation and properties of Neurospora mitochondria.
Meth. Enzymol. X, 142-147 (1967).

GRIFFITHS, A.J.F., H. BERTRAND and T.H. PITTENGER:
Cytochrome spectra of cytoplasmic mutants in Neurospora.
Neurospora Newslett. 13, 16-17 (1968).

HACKETT, D.P., D.W. HAAS, S.K. GRIFFITHS and D.J. NIEDERPRUEM: Studies on development of cyanide-resistant respiration in potato tuber slices.
Plant. Physiol. 35, 8-19 (1960).

HAGIHARA, B., I. MORIKAWA, K. TAGAWA and K. OKUNUKI:
Cristalline animal cytochrome c.
Biochem. Prepn. 6, 1-23 (1958).

HANSSENS, L., and G. von JAGOW: Participation of ubiquinone in the cyanide-insensitive respiration of Moniliella tomentosa.
Abstracts 11th FEBS Meeting, Copenhagen, B6-1, 309 (1977).

HASKINS, F.A., A. TISSIERES, H.K. MITCHELL and M.B. MITCHELL: Cytochromes and the succinic acid oxidase system of poky strains of Neurospora.
J. Biol. Chem. 200, 819-826 (1953).

HENRY, M.F., and E.J. NYNS: Cyanide-insensitive respiration. An alternative mitochondrial pathway.
Sub-Cell. Biochem. 4, 1-65 (1975).

HOUGHTON, R.L., R.J. FISCHER and D.R. SANADI: Effect of dibromothymoquinone on succinate-linked reactions in Escherichia coli.
FEBS Lett. 68, 95-98 (1976).

HUQ, S., and J.M. PALMER: Superoxide and hydrogen peroxide production in cyanide resistant Arum maculatum mitochondria.
Plant Sci. Lett. 11, 351-358 (1978a).

HUQ, S., and J.M. PALMER: Isolation of a cyanide resistant duroquinol oxidase from Arum maculatum mitochondria.
FEBS Lett. 95, 217-221 (1978b).

HUQ, S. and J.M. PALMER: The involvement and possible role of quinone in cyanide resistant respiration.
In: G. DUCET and C. LANCE (eds.), Plant Mitochondria, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 225-232 (1978c).

IKUMA, H.: Electron transport in plant respiration.
Ann. Rev. Plant Physiol. 23, 419-436 (1972).

JAGOW, G.von, and C. BOHRER: Inhibition of electron transfer from ferrocytochrome b to ubiquinone, cytochrome c_1 and duroquinone by antimycin.
Biochim. Biophys. Acta 387, 409-424 (1975).

JAMES, W.O. and H. BEEVERS: The respiration of Arum spadix. A rapid respiration resistant to cyanide.
New Phytol. 49, 353-374 (1950).

JANES, H.W., and S.C. WIEST: Comparison between ageing of slices and C_2H_4 treatment of tubers of Solanum tuberosum "Norchip".
Plant Physiol. 63, Suppl.67: 371 (1979).

JURETIC, D.: Cyanide-resistant respiration of a Neurospora crassa membrane mutant.
J. Bacteriol. 126, 542-543 (1976).

KATZ, R.: Growth phase and rotenone sensitivity in Torulopsis utilis: Difference between exponential and stationary phase.
FEBS Lett. 12, 153-156 (1971).

KATZ, R., L. KILPATRICK and B. CHANCE: Acquisition and loss of rotenone sensitivity in Torulopsis utilis.
Eur. J. Biochem. 21, 301-307 (1971).

KLEIN, J.L., D.L. EDWARDS and S. WERNER: Regulation of mitochondrial membrane assembly in Neurospora crassa.
J. Biol. Chem. 250, 5852-5858 (1975).

KNOWLES, C.J.: Microorganisms and cyanide.
Bacteriol. Rev. 40, 652-680 (1976).

LAMBOWITZ, A.M. and C.W. SLAYMAN: Cyanide-resistant respiration in Neurospora crassa.
J. Bacteriol. 108, 1087-1096 (1971).

LAMBOWITZ, A.M., E.W. SMITH and C.W. SLAYMAN: Electron transport in Neurospora mitochondria. Studies on wild type and poky.
J. Biol. Chem. 247, 4850-4858 (1972a).

LAMBOWITZ, A.M., E.W. SMITH and C.W. SLAYMAN: Oxidative phosphorylation in Neurospora mitochondria. Studies on wild type, poky, and chloramphenicol induced wild type.
J. Biol. Chem. 247, 4859-4865 (1972b).

LAMBOWITZ, A.M., and D. ZANNONI: Cyanide-insensitive respiration in Neurospora. Genetic and biophysical approaches.
In: G.DUCET and C.LANCE, (eds.), Plant Mitochondria, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 283-291 (1978).

LANCE, C. and W.D. BONNER, Jr.: The respiratory chain components of higher plant mitochondria.
Plant Physiol. 43, 756-766 (1968).

LANG, H.: Atmungswege bei vernarbenden und proliferierenden Gewebefragmenten der Kartoffelknolle.
Planta 90, 119-132 (1970).

LEE, S.G. and R.M. CHASSON: Ageing and the development of enhanced respiration in potato tuber tissue. Physiol. Plant. 19, 194-198 (1966).

LIGHT, P.A., C.I. RAGAN, R.A. CLEGG and P.B. GARLAND: Iron-limited growth of Torulopsis utilis, and the reversible loss of mitochondrial energy conservation at Site 1 and of sensitivity to rotenone and piericidin A. FEBS Lett. 1, 4-8 (1968).

LINSMAIER, E.M. and F. SKOOG: Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 18, 100-127 (1965).

LOSCHEN, G. and A. AZZI: Dibromothymoquinone: a new inhibitor of mitochondrial electron transport at the level of ubiquinone. FEBS Lett. 41, 115-117 (1974).

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951).

LUKACS, N. and H. NINNEMANN: DBMIB-Inhibition of cyanide sensitive and cyanide resistant respiration pathway of Neurospora crassa. Abstracts 11th FEBS Meeting, Copenhagen, B6-1, 311 (1977).

LYR, H. and T. SCHEWE: On the mechanism of the cyanide-insensitive alternative pathway of respiration in fungi and higher plants and the nature of the alternative terminal oxidase. Acta Biol. Med. Germ. 34, 1631-1641 (1975).

MARGOLIASH, E. and N. FROHWIRT: Spectrum of horse-heart cytochrome c. Biochem. J. 71, 570-572 (1959).

MATLIB, M.A. and P.J. O'BRIEN: Properties of rat liver mitochondria with intermembrane cytochrome c. Arch. Biochem. Biophys. 173, 27-33 (1976).

MEEUSE, B.J.D.: Thermogenic respiration in Aroids.
Ann. Rev. Plant Physiol. 26, 117-126 (1975).

MELANDRI, B.A., A. BACCARINI MELANDRI, G. LENAZ, E. BERTOLI and L. MASOTTI: The site of inhibition of dibromothymoquinone in mitochondrial respiration.
J. Bioenergetics 6, 125-133 (1974).

MITCHELL, P.: Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems.
J. Theor. Biol. 62, 327-367 (1976).

MITCHELL, M.B. and H.K. MITCHELL: A case of "maternal" inheritance in Neurospora crassa.
Genetics 38, 442-449 (1952).

MOREL, G. and R.H. WETMORE: Tissue culture of Monocotyledons.
Amer. J. Botany 38, 54-64 (1950).

MURASHIGE, T. and F. SKOOG: A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures.
Physiol. Plant. 15, 473-497 (1962).

NICHOLLS, P., E. MOCHAN and H.K. KIMELBERG: Complex formation by cytochrome c: a clue to the structure and polarity of the inner mitochondrial membrane.
FEBS Lett. 3, 242-246 (1969).

NINNEMANN, H., W.L.BUTLER and B.L. EPEL: Inhibition of respiration in yeast by light.
Biochim. Biophys. Acta 205, 499-506 (1970).

NORLING, B., B.D. NELSON, K. NORDENBRAND and L. ERNSTER: Evidence for the occurence of a dual respiratory chain containing different forms of cytochrome b.
Biochim. Biophys. Acta 275, 18-32 (1972).

OETTMEIER, W., S. REIMER and K. LINK: Quantitative structure-activity relationship of substituted benzoquinones as inhibitors of photosynthetic electron transport.
Z. Naturforsch. 33c, 695-703 (1978).

PALMER, J.M.: Identification and regulation of NADH dehydrogenases in plant mitochondria.
Presented at 12th Int. Bot. Congr., Leningrad (1975).

PALMER, J.M.: The organisation and regulation of electron transport in plant mitochondria.
Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 133-157 (1976).

PASSAM, H.C. and J.M. PALMER: Electron transport and oxidative phosphorylation in Arum spadix mitochondria.
J. Exp. Bot. 23, 366-374 (1972).

PELLEGRINI, M.: The giant mitochondria of Euglena gracilis Z. Qualitative and quantitative variations in photoautotrophic, photoheterotrophic and heterotrophic synchronous cultures.
In: G.DUCET and C.LANCE, (eds.), Plant Mitochondria, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 59-60 (1978).

POOLE, R.K. and B.A. HADDOCK: Dibromothymoquinone: an inhibitor of aerobic electron transport at the level of ubiquinone in Escherichia coli.
FEBS Lett. 52, 13-16 (1975).

RAMADAN-TALIB, Z. and J. PREBBLE: Photosensitivity of respiration in Neurospora mitochondria. A protective role for carotenoid.
Biochem. J. 176, 767-775 (1978).

REIMER, S. and A. TREBST: Reversal of dibromothymoquinone inhibition of photosynthetic electron flow by thiol compounds.
Z. Naturforsch. 31c, 103 (1976).

REIMER, S., K. LINK and A. TREBST: Comparison of the inhibition of photosynthetic reactions in chloroplasts by dibromothymoquinone, bromonitrothymol and ioxynil.
Z. Naturforsch. 34c, 419-426 (1979).

RICH, P.R.: Quinol oxidation in Arum maculatum mitochondria and its application to the assay, solubilisation and partial purification of the alternative oxidase.
FEBS Lett. 96, 252-256 (1978).

RICH, P.R. and D.S. BENDALL: The kinetics and thermodynamics of the reduction of cytochrome c by substituted p-benzoquinols in solution.
Biochim. Biophys. Acta 592, 506-518 (1980).

RICH, P.R. and W.D. BONNER, Jr.: Studies on reversed electron transport from cytochrome c_1c and aa_3 in highly cyanide-resistant plant mitochondria.
Abstracts 11th FEBS Meeting, Copenhagen, B6-1, 302 (1977).

RICH, P.R. and W.D. BONNER, Jr.: The nature and location of cyanide and antimycin resistant respiration in higher plants.
In: H. DEGN, D. LLOYD and G.C. HILL (eds.), Functions of Alternative Terminal Oxidases, Pergamon Press, pp. 149-158 (1978a).

RICH, P.R. and W.D. BONNER, Jr.: EPR studies of higher plant mitochondria. II. Center S-3 of succinate dehydrogenase and its relation to alternative respiratory oxidations.
Biochim. Biophys. Acta 501, 381-395 (1978b).

RICH, P.R. and W.D. BONNER, Jr.: An EPR analysis of cyanide-resistant mitochondria isolated from the poky strain of Neurospora crassa.
Biochim. Biophys. Acta 504, 345-363 (1978c).

RICH, P.R. and A.L. MOORE: The involvement of the protonmotive ubiquinone cycle in the respiratory chain of higher plants and its relation to the branchpoint of the alternate pathway.
FEBS Lett. 65, 339-344 (1976).

RICH, P.R., A.L. MOORE, W.J. INGELDEW and W.D. BONNER, Jr.: EPR studies of higher plant mitochondria. I. Ubisemiquinone and its relation to alternative respiratory oxidations.
Biochim. Biophys. Acta 462, 501-514 (1977).

RICH, P.R., N.K. WIEGAND, H. BLUM, A.L. MOORE and W.D. BONNER, Jr.: Studies on the mechanism of inhibition of redox enzymes by substituted hydroxamic acids.
Biochim. Biophys. Acta 525, 325-337 (1978).

RIESKE, J.S.: Composition, structure, and function of Complex III of the respiratory chain.
Biochim. Biophys. Acta 456, 195-247 (1976).

RYCHTER, A., H.W. JANES and C. FRENKEL: Effect of ethylene and oxygen on the development of cyanide-resistant respiration in whole potato mitochondria.
Plant Physiol. 63, 149-151 (1979).

SCATCHARD, G.: The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672 (1949).

SCHONBAUM, G.R., W.D. BONNER, Jr., B.T. STOREY and J.T. BAHR: Specific inhibition of the cyanide-insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hydroxamic acids.
Plant Physiol. 47, 124-128 (1971).

SCHWAB, A.J.: Mitochondrial protein synthesis and cyanide-resistant respiration in copper-depleted, cytochrome oxidase-deficient Neurospora crassa.
FEBS Lett. 35, 63-66 (1973).

SCOTT, W.A. and H.K. MITCHELL: Secondary modification of cytochrome c by Neurospora crassa.
Biochemistry 8, 4282-4289 (1969).

SIEDOW, J.N., S.C. HUBER and D.E. MORELAND:Inhibition of mung bean mitochondrial electron transfer by dibromothymoquinone.
In: G. DUCET and C. LANCE (eds.), Plant Mitochondria, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 233-240 (1978).

SIEDOW, J.N., S.C. HUBER and D.E. MORELAND: Effects of dibromothymoquinone on mung bean mitochondrial electron transfer and membrane fluidity.
Biochim. Biophys. Acta 547, 282-295 (1979).

SLAYMAN, C.W., D.C. REES, P.P. ORCHARD and C.L. SLAYMAN: Generation of adenosine triphosphate in cytochrome-deficient mutants of Neurospora.
J. Biol. Chem. 250, 396-408 (1975).

SOLOMOS, T.: Cyanide-resistant respiration in higher plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 28, 279-297 (1977).

SOLOMOS, T. and G.G. LATIES: The mechanism of ethylene and cyanide action in triggering the rise in respiration in potato tubers.
Plant Physiol. 55, 73-78 (1975).

SOLOMOS, T. and G.G. LATIES: Effects of cyanide and ethylene on the respiration of cyanide-sensitive and cyanide-resistant plant tissues.
Plant Physiol. 58, 47-50 (1976).

SOTTOCASA, G.L., B. KUYLENSTIERNA, L. ERNSTER and A. BERGGSTRAND: An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study.
J. Cell Biol. 32, 415-438 (1967).

STOREY, B.T.: The respiratory chain of plant mitochondria. VI. Flavoprotein components of the respiratory chain of mung bean mitochondria.
Plant Physiol. 46, 13-20 (1970a).

STOREY, B.T.: The respiratory chain of plant mitochondria. VIII. Reduction kinetics of the respiratory chain carriers of mung bean mitochondria with NADH.
Plant Physiol. 46, 625-630 (1970b).

STOREY, B.T.: The respiratory chain of plant mitochondria. X. Oxidation-reduction potentials of the flavoproteins of skunk cabbage mitochondria.
Plant Physiol. 48, 493-497 (1971).

STOREY, B.T.: The respiratory chain of plant mitochondria. XV. Equilibration of cytochromes c_{549}, b_{553}, b_{557} and ubiquinone in mung bean mitochondria: placement of cytochrome b_{557} and the estimation of the midpoint potential of ubiquinone.
Biochim. Biophys. Acta 292, 592-603 (1973).

STOREY, B.T.: The respiratory chain of plant mitochondria. XVIII. Point of interaction of the alternate oxidase with the respiratory chain.
Plant Physiol. 58, 521-525 (1976).

STOREY, B.T. and J.T. BAHR: The respiratory chain of plant mitochondria. I. Electron transport between succinate and oxygen in skunk cabbage mitochondria.
Plant Physiol. 44, 115-125 (1969).

SUN, I.L. and F.L. CRANE: Coordinated, coenzyme Q reversible, 2,5-dibromothymoquinone inhibition of electron transport and ATPase in Escherichia coli.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 68, 190-196 (1976).

SURKOV, S.A. and A.KONSTANTINOV: Dibromothymoquinone interaction with the CoQ-cytochrome b locus of the mitochondrial respiratory chain.
FEBS Lett. 109, 283-288 (1980).

TAKEBE, I., Y. OTSUKI and S. AOKI: Isolation of tobacco mesophyll cells in intact and active state.
Plant-Cell. Physiol. (Tokyo) 9, 115-124 (1968).

TOMLINSON, P.F., Jr. and D.E. MORELAND: Cyanide-resistant respiration in sweet potato mitochondria.
Plant Physiol. 55, 365-369 (1975).

TREBST, A., E. HARTH and W. DRABER: On a new inhibitor of photosynthetic electron-transport in isolated chloroplasts.
Z. Naturforsch. 25b, 1157-1159 (1970).

VAN DER PLAS, L.H.W. and J.D. VERLEUR: CN-resistant respiration in potato (Solanum tuberosum L.). Changes after storage of the tuber.
Plant Sci. Lett. 7, 149-154 (1976).

VAN DER PLAS, L.H.W. and M.J. WAGNER: Changeing of respiratory characteristics of potato tuber mitochondria with callus and periderm induction.
In: G.DUCET and C.LANCE, (eds.), Plant Mitochondria, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 373 - 380 (1978).

VAN DER PLAS, L.H.W., M.J. WAGNER and J.D. VERLEUR: Changes in respiratory pathways of potato tuber (Solanum tuberosum L.) after various times of storage of the tuber. Comparison of wounded and non-wounded tissue.
Z. Pflanzenphysiol. 79, 218-236 (1976).

VOGEL, H.J.: A convenient growth medium for Neurospora (Medium N).
Microbial Genet. Bull. 13, 42-43 (1956).

WARDEN, J.T. and D.L. EDWARDS: Electron spin resonance investigations of mitochondrial electron transport in Neurospora crassa.
Eur. J. Biochem. 71, 411-418 (1976).

WEISS, H., G. von JAGOW, M. KLINGENBERG and T. BÜCHER: Characterization of Neurospora crassa mitochondria prepared with a grind-mill.
Eur. J. Biochem. 14, 75-82 (1970).

YU, C.A., S.NAGAOKA, L. YU and T.E. KING: Evidence for the existence of a ubiquinone protein and its radical in the cytochrome b and c_1 region in the mitochondrial electron transport chain.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 82, 1070-1078 (1978).

YU, C.A., L. YU and T.E. KING: The existence of an ubiquinone binding protein in the reconstitutively active cytochrome b-c_1 complex
Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 259-265 (1977a).

YU, C.A., L. YU and T.E. KING: Reconstitution of succinate-Q reductase.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 79, 939-946 (1977b).

ZAUGG, W.S. and J.S. RIESKE: The quantitative estimation of cytochrome b in submitochondrial particles from beef heart.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 9, 213-217 (1962).

Lebenslauf

Name:	Noémi Lukács, geb. Lukács
geboren:	3 Februar 1949 in Budapest/Ungarn
Familienstand:	verheiratet
Schulausbildung:	Grundschule in Szirák/Ungarn von 1955 bis 1963, Asztalos János Polytechnikum für Gartenbau in Budapest von 1963 bis 1967 Abitur: 14. Juni 1967
Studium:	der Biologie mit Schwerpunkt Biochemie von 1967 bis 1972 an der Eötvös Loránd Wissenschaftlichen Universität in Budapest. Staatsexamen in Biochemie und Philosophie. Diplomarbeit von September 1971 bis Mai 1972 im Biochemischen Institut der Eötvös Loránd Universität in Budapest ("Kompetitive Hemmung der ATPase Aktivität des Myosins" bei Dr. G. Kelemen). Diplom: 4. Juli 1972
	der Biochemie vom WS 1975/76 bis WS 1980/81 an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Arbeitsplätze:	Forschungsinstitut für Tierzüchtung (Herceghalom, Ungarn), Max-Planck-Institut für Biologie Abt. Melchers und Abt. Beermann in Tübingen, Institut für Chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen.
Dissertation.	von März 1975 bis Oktober 1980 im Institut für Chemische Pflanzenphysiologie der Universität Tübingen unter Leitung von Frau Prof. Dr. H. Ninnemann
Akademische Lehrer:	Gy. Ádám, E. Biró, P. Elődi, T. Keleti, Gy. Kertész, D. Knausz, L. Kondics, A. Kótai, J. Kovács, T. Simon, M. Szabolcsiné, L. Tigyi und E. Zapp in Budapest, und Herr Prof. Dr. H. Metzner und Frau Prof. Dr. H. Ninnemann in Tübingen.

D. GRÄBNER
DISSERTATIONS U. OFFSETDRUCKEREI
Gotenstraße 3
8602 Altendorf bei Bamberg
Telefon: 09545 / 8791